



**Adriana Cristina Faria
Gomes**

**Análise de hidrocarbonetos de óleos minerais em
alimentos**



**Adriana Cristina Faria
Gomes**

**Análise de hidrocarbonetos de óleos minerais em
alimentos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Augusto Costa Tomé e do Doutor Mário Manuel Quialheiro Simões, respetivamente Professor Associado com Agregação e Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais.

o júri

presidente

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

professor auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Vanessa Jesus de Oliveira

bolseira de pós-doutoramento, CESAM e Departamento de Biologia

Doutor Mário Manuel Quialheiro Simões

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que me acompanharam ao longo da minha formação académica e contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Doutor Mário Simões e Doutor Augusto Tomé, pelo conhecimento que me transmitiram, pela atenção e recomendações dadas.

Aos meus pais, por todo o esforço que têm feito para me dar todas as condições necessárias ao meu sucesso, pela paciência, ajuda e confiança.

À minha irmã, pelo companheirismo, incentivo e disponibilidade para me ajudar.

À restante família, pelo afeto, amabilidade e força que sempre me deram.

Ao Adriano, por estar sempre do meu lado e pela confiança.

Aos meus maravilhosos amigos por estarem sempre presentes.

palavras-chave

Óleos minerais, hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, segurança e qualidade alimentar, contaminação de alimentos.

resumo

O presente trabalho compreendeu duas componentes, uma sobre o trabalho desenvolvido durante o estágio realizado a nível empresarial e outra sobre o trabalho laboratorial desenvolvido no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. A implementação de sistemas de segurança e qualidade é uma importante ferramenta para que as empresas do sector alimentar produzam e forneçam produtos de qualidade. A Du Bois de La Roche é uma empresa especializada no fabrico de biscoitos com um sistema de gestão de qualidade e código de boas práticas de fabrico implementados. As atividades realizadas na empresa envolveram a inspeção de produtos e processos de fabrico, assegurando uma aplicação eficaz das medidas de segurança e higiene. Os hidrocarbonetos de óleos minerais (MOH) são compostos passíveis de contaminar os alimentos ao longo das várias etapas de fabrico. Estes contaminantes podem ser divididos em hidrocarbonetos saturados e hidrocarbonetos aromáticos. Estes últimos representam maior perigo para a saúde por serem potencialmente cancerígenos. No presente estudo, foram analisadas amostras de açúcar e de arroz, recorrendo à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa para avaliar a contaminação por MOH. Tanto nas duas amostras de arroz como no açúcar os hidrocarbonetos de óleos minerais pesquisados estavam abaixo do limite de deteção. A contaminação das amostras de arroz por ésteres de glicidilo (oleato de glicidilo e palmitato de glicidilo) também foi analisada e quantificada. O palmitato de glicidilo encontrava-se abaixo do limite de quantificação, mas foi detetada uma contaminação por oleato de glicidilo de 13,7 mg/kg no arroz basmati e de 11,2 mg/kg no arroz agulha. Os ésteres de glicidilo são conhecidos como contaminantes de óleos vegetais refinados. Assim sendo, a contaminação do arroz pode resultar da utilização de óleos lubrificantes de origem vegetal em equipamentos industriais.

keywords

Mineral oils, saturated hydrocarbons, aromatic hydrocarbons, food safety and quality, food contamination.

abstract

The present work comprised two components, one on the work developed during the internship in industry and the other on the laboratory work developed at the university. The implementation of food safety and quality systems is an important tool for food companies to provide quality products, ensuring consumer confidence and loyalty. Du Bois De La Roche is a company specialized in the manufacture of biscuits with a system of quality management and code of good manufacturing practices implemented. The activities carried out in the company involved the inspection of products and manufacturing processes, ensuring the effective application of the safety and hygiene measures. Mineral oil hydrocarbons (MOH) are contaminants capable of contaminating food throughout the various stages of manufacture. These contaminants can be divided into saturated hydrocarbons and aromatic hydrocarbons, with the latter posing a greater health hazard because they are potentially carcinogenic. In this study, sugar and rice samples were analyzed by coupled gas chromatography–mass spectrometry to evaluate MOH contamination. In both rice and sugar the studied mineral oil hydrocarbons were below the detection limit. The contamination by glycidyl esters (glycidyl oleate and glycidyl palmitate) was also analyzed and quantified in rice samples. Glycidyl palmitate was below the limit of quantification, however a glycidyl oleate contamination of 13.7 mg/kg in basmati rice and 11.2 mg/kg in long grain rice was detected. Glycidyl esters are contaminants of refined vegetable oils, so contamination in rice can result from the use of lubricants based on vegetable oils in industrial equipment.

Índice

Lista de Abreviaturas e Acrónimos	6
Capítulo I – Trabalho desenvolvido no estágio na Du Bois de La Roche.....	8
1. Introdução.....	8
1.1. Apresentação da empresa.....	8
1.2. Biscoitos.....	9
1.2.1. Principais ingredientes.....	9
1.2.1.1. Farinha de trigo.....	9
i. Amido	10
ii. Proteínas	12
1.2.1.2. Gordura.....	13
1.2.1.3. Açúcar.....	14
1.3. Segurança e Qualidade Alimentar	15
1.3.1. Perigos	17
1.3.2. Controlos de segurança e qualidade em biscoitos	18
1.3.2.1. Boas práticas de fabrico.....	18
1.3.2.2. Inspeção do produto final	19
2. Trabalho realizado.....	20
2.1. Registo da temperatura e humidade das diferentes secções.....	20
2.2. Controlo de pesagem	20
2.3. Controlo destrutivo	21
2.3.1. Controlo da embalagem.....	22
2.3.2. Controlo das dimensões e teor de humidade dos biscoitos	23
2.3.3. Análise sensorial.....	23
2.4. Detetor de metais	24
Capítulo II – Análise de hidrocarbonetos de óleos minerais em alimentos.....	25
1. Introdução.....	25
1.1. Hidrocarbonetos de óleos minerais	25
1.2. Fontes de contaminação	26
1.3. Toxicidade	27
1.4. Genotoxicidade e carcinogenicidade	29
1.5. Legislação	30

1.6.	Método de análise	31
1.6.1.	Preparação da amostra	31
1.6.2.	Determinação analítica	32
1.6.3.	Métodos auxiliares.....	34
1.7.	Hidrocarbonetos de óleos minerais em alimentos	35
1.8.	Objetivos	37
2.	Materiais e Métodos	38
2.1.	Amostras	38
2.2.	Produtos químicos e soluções	38
2.2.1.	Testes de recuperação	38
2.2.2.	Quantificação de MOH.....	39
2.2.3.	Quantificação de oleato de glicidilo e de palmitato de glicidilo.	39
2.3.	Preparação das amostras	40
2.4.	Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa - Parâmetros da técnica	40
3.	Resultados	41
3.1.	Desempenho do método de extração	41
3.2.	Quantificação de MOH (em modo SIM)	43
3.3.	Quantificação de oleato de glicidilo e de palmitato de glicidilo (em modo de varrimento).....	43
4.	Discussão.....	44
5.	Conclusões	48
	Capítulo III – Referências.....	50
	Anexos.....	56

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática de diferentes níveis de organização dos grânulos de amido: (a) grânulo com regiões amorfas e semi-cristalinas alternadas; (b) região semi-cristalina expandida, consistindo em camadas amorfas e cristalinas alternadas; (c) organização da amilopectina dentro das camadas cristalinas. Adaptado de (14).....	11
Figura 2 – Exemplos das diferentes classes de hidrocarbonetos presentes no petróleo.....	25
Figura 3 – Estrutura de um éster de glicidol e de ácido gordo (R – cadeia do ácido gordo)...	37
Figura 4 – Cromatogramas (<i>split</i> ; varrimento) de açúcar (A) e hexano (B) com os vários padrões adicionados intencionalmente para determinação das percentagens de recuperação. Os resultados apresentados correspondem a uma experiência representativa de três réplicas.	42
Figura 5 – Cromatogramas (<i>splitless</i> ; varrimento) dos extratos de arroz agulha (A) e arroz basmati (B), onde é possível observar os picos correspondentes a PG e OG. Os dados estão apresentados a partir de cerca dos 17,5 min e correspondem a uma experiência representativa de três réplicas.	44
Figura A1 – Gráficos da razão entre a área do sinal do padrão (A) e a área do sinal do PI (A_{PI}) em função da concentração (mg/ml) do padrão. As equações das retas permitem determinar a concentração de cada padrão adicionado intencionalmente nas amostras, para obter as percentagens de recuperação. Em cada gráfico está identificado o padrão correspondente.....	55
Figura A2 – Gráficos da razão entre a área do sinal do padrão (A) e a área do sinal do PI (A_{PI}) em função da concentração (mg/ml) do padrão. As equações das retas permitem determinar a concentração de cada um dos MOH presente nas amostras. Em cada gráfico está identificado o padrão correspondente.....	56
Figura A3 – Gráfico da razão entre a área do sinal do PM (A) e a área do sinal do PI (A_{PI}) em função da concentração (mg/ml) do PM. A equação da reta permite determinar as concentrações de OG e de PG presentes nas amostras de arroz.....	57
Figura A4 – Cromatogramas (<i>splitless</i> ; varrimento) das amostras de açúcar (A), de arroz basmati (B) e de arroz agulha (C), nos quais se pode verificar que não foi detetado nenhum sinal de MOH nos extratos de hexano.....	59

Figura A5 – Cromatograma (<i>splitless</i> ; varrimento) do padrão PM 5, onde estão identificados os sinais do PI (0,0520 mg/ml) aos 17,9 min e do PM (0,0629 mg/ml) aos 35,6 min.....	60
Figura A6 – Espectros de MS obtidos do TIC das amostras e que foram identificados pela livreria do equipamento como correspondendo o oleato de glicidilo (A) e ao palmitato de glicidilo (B).....	60

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Concentrações (mg/ml) dos padrões individuais adicionados para obter as soluções padrão 1 a 6, utilizadas para traçar as retas de calibração necessárias para os testes de recuperação	38
Tabela 2 – Concentrações (mg/ml) dos padrões A a F, utilizados para traçar as retas de calibração necessárias para quantificar MOH nas amostras, em modo SIM.....	39
Tabela 3 – Valores da razão massa/carga (m/z) e respetivo intervalo de tempo utilizados em modo SIM para determinar os MOH (utilizados como padrões) nos extratos de arroz e açúcar.....	41
Tabela 4 – Média das percentagens de recuperação obtidas para 3 réplicas de cada amostra e do ensaio controlo e respetivo desvio padrão. O ponto de ebulição (p.e.) de cada MOH é também apresentado.	42
Tabela 5 – Limites de deteção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os vários MOH (mg/kg), pesquisados nos extratos.	43
Tabela 6 – Resultados obtidos nos ensaios de quantificação de MOH, OG e PG nas amostras de açúcar, arroz agulha e arroz basmati.....	47
Tabela A1 – Volumes (μ l) das soluções padrão individuais adicionados para obter as soluções padrão 1 a 6, utilizadas para traçar as retas de calibração necessárias para os testes de recuperação em modo de varrimento.....	58
Tabela A2 – Volumes (μ l) da solução padrão stock (semelhante ao Padrão 2) e da solução stock de PI adicionados para obter as soluções padrão A a F, utilizadas para traçar as retas de calibração necessárias para quantificar MOH em modo SIM.....	58
Tabela A3 – Volumes (μ l) da solução stock de PM e da solução stock de PI adicionados para obter as soluções padrão PM 1 a PM 5, utilizadas para traçar a reta de calibração necessária para quantificar OG e PG em modo de varrimento.....	58

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

2-EN – 2-etilnaftaleno

ADI – Ingestão diária admissível

C₁₈ – Octadecano

C₂₄ – Tetracosano

C₃₀ – Triacontano

Cycy – Ciclo-hexilciclo-hexano

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FID – Detetor de ionização de chama

GC – Cromatografia gasosa

HACCP – Análise de perigos e pontos críticos de controlo

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IFS – *International Featured Standards*

ISO – Organização Internacional de Padronização

LC – Cromatografia líquida

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

MOAH – Hidrocarbonetos aromáticos de óleos minerais

MOH – Hidrocarbonetos de óleos minerais

MOSH – Hidrocarbonetos saturados de óleos minerais

MS – Espectrometria de Massa

NOAEL – Nível de efeito adverso não observado

OG – Oleato de glicidilo

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAH – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PB - Pentilbenzeno

PCC – Ponto crítico de controlo

Per – Perileno

PI – Padrão interno

PM – Palmitato de metilo

PG – Palmitato de glicidilo

SCF – Comité Científico da Alimentação

SIM – *Selected ion monitoring*

TIC – *Total ion chromatogram*

Capítulo I – Trabalho desenvolvido no estágio na Du Bois de la Roche

1. Introdução

1.1. Apresentação da empresa

A Du Bois de la Roche é uma empresa de origem francesa, fundada em 1950 por José Louis Dubois. Com sede em Portugal desde 1980 é especializada no fabrico de biscoitos folhados. Ao nível da produção, a empresa encontra-se dividida em três secções: sala de fabricação, onde são preparadas as massas, sala de embalagem, onde estão presentes os fornos e os equipamentos de empacotar, e armazéns das matérias-primas e dos produtos finais. A empresa tem três linhas de produção: uma linha de palmiers (biscoito folhado tipicamente francês), uma linha mista (biscoitos folhados e biscoitos secos) e uma linha de biscoitos secos, que estão ativas continuamente. Desta forma, o horário dos operadores da fabricação e da embalagem é dividido em três turnos, sendo necessário assegurar que são analisadas, pelos controladores de qualidade, amostras de todos os produtos fabricados em cada turno.

Os ideais da empresa assentam na adoção de um comportamento responsável e dinâmico, estabelecendo uma rigorosa Política de Qualidade e de Segurança Alimentar. Além dos controlos tidos no processo de fabricação, a Du Bois de La Roche aposta também numa criteriosa seleção dos seus fornecedores, procurando obter as melhores matérias-primas. Deste modo, oferece um nível de confiança muito elevado, que constitui uma referência no mercado. Em 2003 a empresa obteve a certificação da qualidade ISO 9001:2000 (requisitos para o sistema de gestão de qualidade) e de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP), devido aos rigorosos métodos de controlo no fabrico dos seus produtos. Na sequência do Sistema de Qualidade implementado, a Du Bois de la Roche obteve em 2010 a Certificação IFS (*International Featured Standards*) versão 5. A procura constante por um excelente desempenho, através de uma política de investimento contínuo, é uma prioridade da empresa.

O estágio na Du Bois de La Roche teve como objetivos a aplicação em ambiente empresarial dos conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico e a aquisição de conhecimento sobre normas e certificações de qualidade, nomeadamente as suas aplicações práticas, obtendo-se assim experiência profissional. Para tal, o estágio compreendeu a realização de atividades na empresa, na área de controlo de segurança e qualidade dos

biscoitos, intervindo nas diferentes etapas de produção, embalagem e armazenamento. As principais tarefas compreenderam a inspeção dos produtos e o controlo de processos de fabrico, verificando a sua conformidade com as normas de qualidade, higiene e segurança.

1.2. Biscoitos

A palavra “biscoito” é um termo muito abrangente em vários países, podendo incluir produtos doces, salgados, mais ou menos estaladiços, com a adição de chocolate, frutos, creme, entre outros. Todos estes produtos são feitos com farinha (sobretudo farinha de trigo) e apresentam baixo teor de humidade o que possibilita terem uma longa validade (geralmente superior a 6 meses) se protegidos da humidade e do oxigénio. Tecnicamente, a diferença entre biscoitos e pão está no nível de enriquecimento com gordura e açúcar e no teor de humidade.¹

A produção de biscoitos representa uma parte significativa da indústria alimentar em vários países devido ao longo prazo de validade, a serem alimentos práticos e terem preços acessíveis. No entanto, isto relaciona-se com o desenvolvimento da mecanização, que permitiu aumentar consideravelmente a velocidade de produção, resultando em produtos de qualidade a baixo custo. Atualmente, o progresso da indústria alimentar concentra-se no controlo do processo, de modo a obter rendimentos máximos e no desenvolvimento de novos produtos que atraiam os consumidores, nomeadamente na área de alimentos dietéticos e funcionais.¹

1.2.1. Principais ingredientes

1.2.1.1. Farinha de trigo

Proveniente da família *Graminae*, tal como os demais cereais, o trigo pertence ao género *Triticum*.² Dentro deste género, existe um elevado número de variedades, sendo *Triticum durum* e *Triticum aestivum* as espécies mais produzidas. A primeira é utilizada principalmente para a produção de massas alimentícias e a segunda para a produção de pão e outros produtos de pastelaria.³ O trigo é uma planta bastante resistente, com capacidade para crescer em variadas condições ambientais e de solo, exceto nas regiões árticas.⁴

O grão de trigo é composto por 3 partes: farelo, endosperma e gérmen. O farelo compreende cerca de 12% do grão, é constituído por várias camadas e apresenta geralmente uma cor castanha ou avermelhada. O endosperma constitui a maior porção do grão (cerca de

85,5%) e é a parte útil para a produção da farinha. É composto pelo endosperma amiláceo e pela camada de aleurona. As células com grânulos de amido encontram-se envolvidas por uma matriz proteica, formada essencialmente por proteínas de armazenamento (glúten). O gérmen ou embrião compreende apenas 2,5% do grão, sendo a parte mais rica em gordura e não contém amido.^{2,5}

A farinha de trigo resulta da moagem dos grãos de trigo. Durante este processo o endosperma é separado do gérmen e do farelo, sendo reduzido gradualmente o seu tamanho, até formar a farinha. A remoção do gérmen permite a obtenção de farinhas sem um paladar rançoso.⁵ Por sua vez, a remoção do farelo para obtenção de farinhas brancas implica a perda de valor nutricional. O farelo é rico em fibra dietética, vitaminas e minerais e o reconhecimento dos seus benefícios tem conduzido a um aumento da utilização de farinha integral na produção de alimentos à base de cereais. De todos os cereais cultivados, a farinha de trigo apresenta características únicas que justificam a sua utilização numa ampla gama de produtos alimentares. Esta farinha permite a formação de uma massa coesiva com propriedades viscoelásticas e tem também a capacidade de reter bolhas de gás, originando produtos com uma textura leve e agradável.^{4,6} Embora a farinha seja o ingrediente principal da maioria dos biscoitos, a sua contribuição a nível do sabor é mínima, tendo um importante papel na textura, dureza e forma.

i. Amido

O amido é o principal componente da farinha de trigo representando cerca de 70% da sua massa. No trigo, tal como noutros cereais, o amido encontra-se armazenado no endosperma na forma de grânulos insolúveis, distinguindo-se duas formas distintas: tipo A e tipo B. Os grânulos do tipo A são os maiores, com um diâmetro superior a 10 µm e em forma de disco. Os grânulos do tipo B têm um diâmetro inferior a 10 µm e apresentam uma forma esférica.^{7,8} A morfologia e distribuição dos grânulos varia de acordo com a origem botânica e é influenciada por fatores ambientais.^{9,10}

Os grânulos de amido são principalmente constituídos por dois polímeros de glucose, a amilose e a amilopectina. A amilose é uma molécula essencialmente linear com ligações α -(1,4) entre unidades de D-glucopirranose.¹¹ Quando em solução aquosa, a amilose adota uma conformação helicoidal, podendo formar complexos de inclusão com agentes complexantes, como lípidos, emulsificantes e álcoois.^{12,13} A amilopectina é uma molécula

maior, sendo também composta por unidades de D-glucopiranosose unidas entre si por ligações α -(1,4) mas apresenta uma estrutura mais ramificada do que a amilose.¹⁴

Quando vistos à luz polarizada, os grânulos de amido exibem birrefringência, o que indica um elevado nível de organização.¹⁴ A estrutura dos grânulos de amido intactos consiste em regiões semi-cristalinas e regiões não cristalinas alternadas, designadas por anéis de crescimento. Nas regiões semi-cristalinas distinguem-se camadas amorfas e camadas cristalinas. As camadas cristalinas são constituídas pelas cadeias externas da amilopectina dispostas em hélices duplas. Os pontos de ramificação da amilopectina, assim como moléculas de amilose, não contribuem para a cristalinidade e encontram-se nas camadas amorfas (Figura 1).^{5,14}

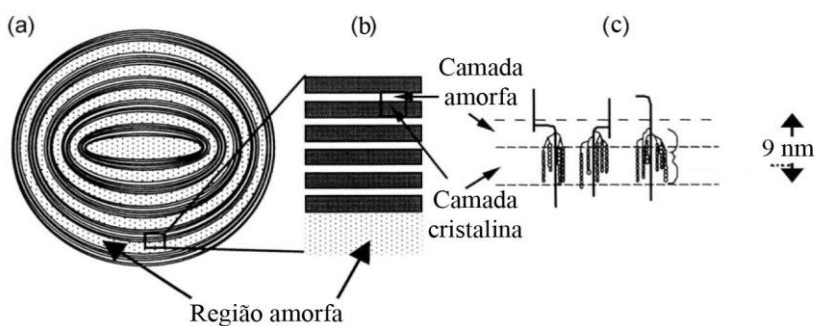


Figura 1 – Representação esquemática de diferentes níveis de organização dos grânulos de amido: (a) grânulo com regiões amorfas e semi-cristalinas alternadas; (b) região semi-cristalina expandida, consistindo em camadas amorfas e cristalinas alternadas; (c) organização da amilopectina dentro das camadas cristalinas. Adaptado de (14).

À temperatura ambiente e na presença de água, os grânulos de amido podem absorver até 50% do seu peso seco de água. Acima de uma determinada temperatura (temperatura de gelatinização), a organização dos grânulos é destruída irreversivelmente. Este processo designa-se gelatinização.¹⁴ O processo de gelatinização envolve a hidratação das regiões amorfas dos grânulos o que induz a mudança de um estado rígido para um estado elástico, provocando uma transição molecular irreversível que envolve a dissociação das hélices duplas de amilopectina. Desta forma, os grânulos perdem a birrefringência e a cristalinidade. O processo de gelatinização tem início a uma temperatura de cerca de 45 °C, atinge um pico a temperaturas próximas dos 60 °C e termina por volta dos 75 °C. A temperaturas mais elevadas forma-se uma pasta de amido, que consiste em grânulos inchados e amorfos e macromoléculas solubilizadas.¹⁵ Quando a pasta de amido amorna, os

polissacarídeos reassociam-se para um estado mais organizado ou mesmo cristalino, num processo designado retrogradação.¹⁴ Inicialmente formam-se hélices duplas entre moléculas de amilose que solubilizaram durante a gelatinização, formando uma rede contínua entre os grânulos remanescentes. Após algumas horas essas associações entre as moléculas de amilose formam estruturas cristalinas.^{14,16} A recristalização da amilopectina é um processo mais demorado que ocorre nos grânulos gelatinizados, sendo responsável pelas alterações a longo-prazo da firmeza dos géis de amido.¹⁶ Na presença de emulsionantes, estes podem complexar com o amido, essencialmente com a amilose, reduzindo a sua disponibilidade para formar a pasta de amido e posterior recristalização. Assim, formam-se produtos com uma textura mais suave.¹⁴

ii. Proteínas

As proteínas compreendem entre 10 a 12% da farinha de trigo.¹⁴ Osborne¹⁷ classificou as proteínas vegetais de acordo com a sua solubilidade em diferentes solventes: água, soluções diluídas de sais, soluções alcoólicas e soluções diluídas de ácidos ou bases. Desta forma, as proteínas do trigo classificam-se em albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas, respetivamente. Embora esta classificação seja ainda utilizada devido à sua simplicidade, exclui uma parte das proteínas do trigo que não são extraídas com nenhum destes solventes. As proteínas também podem ser classificadas com base nas suas propriedades funcionais, distinguindo-se dois grupos de proteínas do trigo: proteínas que não fazem parte do glúten (não-glúten) e proteínas do glúten.¹⁸

As proteínas não-glúten representam entre 15 e 20% do total de proteínas do trigo e encontram-se essencialmente no gérmen e nas camadas de aleurona.¹⁹ A maioria destas proteínas podem ser extraídas com água ou soluções diluídas de sais. Grande parte das proteínas não-glúten são monoméricas, e são ativas fisiologicamente ou têm funções estruturais.¹⁸ As proteínas do glúten (80 – 85% do total de proteínas do trigo) são as principais proteínas de armazenamento do trigo e pertencem à classe das prolaminas.^{14,18} Estas proteínas apresentam muito baixa solubilidade em água ou em soluções diluídas de sais devido aos baixos níveis de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis e elevado teor em aminoácidos apolares.¹⁸ As proteínas do glúten são caracterizadas por conterem elevados níveis de glutamina e prolina.⁵ Podem-se distinguir dois grupos de proteínas: gliadinas e

gluteninas. As gliadinas representam uma mistura heterogénea de proteínas monoméricas e as gluteninas são uma mistura heterogénea de polímeros.¹⁸

Embora as proteínas não-glúten possam desempenhar um papel no potencial das farinhas de trigo na produção de variados produtos, é geralmente aceite que são as proteínas do glúten que determinam esse potencial.¹⁸ Na preparação das massas, a farinha de trigo é hidratada e, devido às forças de cisalhamento e de tração aplicadas ao longo da mistura, as proteínas do glúten formam uma rede viscoelástica contínua que preenche os espaços entre os grânulos de amido.²⁰ A qualidade e quantidade das proteínas do glúten são fatores determinantes no processo de mistura da massa, uma vez que influenciam as propriedades reológicas e a capacidade de retenção de gás nas massas fermentativas.^{21,22} Existem essencialmente dois fatores que afetam a qualidade do glúten. O primeiro prende-se com a razão entre gliadinas e gluteninas, uma vez que desempenham diferentes funções na rede proteica. Uthayakumaran *et al.*²³ estudando as propriedades reológicas de massas de trigo, verificaram que as massas com maior teor em gluteninas são mais resistentes à deformação. Pelo contrário, massas com maior teor de gliadinas apresentam maior extensibilidade. Khatkar *et al.*²⁴ verificaram também que um maior teor em gliadinas leva a uma diminuição da elasticidade, o que pode ser atribuído a um efeito plastificante destas proteínas. Portanto, as gluteninas fornecem elasticidade, ao passo que as gliadinas fornecem viscosidade. O segundo fator que tem influência na qualidade do glúten relaciona-se com a qualidade das gluteninas. Diferente composição pode resultar em diferenças nas interações não-covalentes, importantes para a elasticidade. A estrutura e o tamanho dos polímeros pode também afetar a qualidade e, consequentemente, a funcionalidade das gluteninas.^{18,21}

Para a produção de biscoitos são escolhidas farinhas de trigo com um baixo teor de proteínas, formando um glúten mais fraco. Contudo, são adicionados açúcares, gorduras e outros ingredientes que afetam a consistência da massa.⁵

1.2.1.2. Gordura

A gordura é um dos ingredientes mais importantes nos biscoitos, fornecendo estrutura, sabor e qualidade. Uma das principais funções da gordura é condensar a massa (*shortening*), concedendo-lhe uma textura quebradiça, característica de biscoitos. A gordura adicionada durante a mistura da massa forma um revestimento em torno da farinha para limitar que a água da mistura entre em contacto com a farinha.²⁵ Isto é um aspeto importante nos biscoitos,

visto que, quando a água entra em contacto com a farinha e com a ação da mistura, o glúten desenvolve-se, tornando-se mais extensível e fortalece a massa. Esta propriedade não é desejável em biscoitos, pois torná-los-ia duros, quebradiços e desagradáveis.²⁶ Maache-Rezzoug *et al.*²⁵ estudaram o efeito da gordura no comportamento reológico de massas de biscoitos, tendo verificado que massas com maior adição de gordura eram mais homogêneas e suaves. Observaram também que o aumento do teor em gordura provoca uma diminuição da viscosidade da massa, o que pode dever-se ao efeito suavizante da gordura que confere também um carácter plástico.

Uma função secundária da adição de gordura é a sua capacidade de revestir pequenas bolhas de ar que possam estar presentes, evitando que se aglutinem em bolhas maiores. Isto permite a manutenção de uma boa estrutura da massa. Em alguns biscoitos utiliza-se ainda outra gordura que lhes confere características escamosas que os distinguem. Esta gordura é conhecida como gordura de laminação, pois é utilizada para formar camadas na massa durante a fabricação.²⁶

1.2.1.3. Açúcar

O açúcar é um importante ingrediente dos biscoitos uma vez que contribui para a sua textura, sabor e cor. O açúcar mais utilizado é a sacarose, proveniente da cana-de-açúcar.²⁷ Durante a mistura da massa, o açúcar compete com a farinha pela água, restringindo o desenvolvimento da rede contínua de glúten e a gelatinização do amido, contribuindo para a obtenção de biscoitos crocantes.²⁸

A sacarose funciona como um agente endurecedor na medida em que se dissolve durante a preparação da massa, todavia volta a cristalizar com o arrefecimento dos produtos, tornando-os crocantes. No entanto, se adicionada em excesso tem um efeito amolecedor.^{28,29} Num estudo desenvolvido por Maache-Rezzoug *et al.*,²⁵ no qual se avaliou o efeito de alguns ingredientes nas propriedades reológicas de massa para biscoitos, verificou-se que elevadas concentrações de açúcar originam massas extremamente macias e menos viscosas. Manohar *et al.*²⁸ também obtiveram resultados semelhantes, tendo verificado que a adição de açúcar torna a massa mais macia e menos consistente e elástica. Ainda neste estudo foi possível observar que os biscoitos com maior concentração de açúcar apresentam maior extensão e menor resistência à compressão. Portanto, devido à capacidade da sacarose para reter água, o açúcar quando utilizado em quantidades excessivas pode atuar como amaciante.

A sacarose é um dissacarídeo composto por glucose e frutose. Se a sacarose em solução for hidrolisada, libertam-se açúcares redutores. Os açúcares redutores podem-se combinar com grupos amino livres, ocorrendo a reação de Maillard. Esta reação é responsável pelo desenvolvimento de compostos poliméricos coloridos, designados por melanoidinas. Parte da cor mais escura da superfície dos biscoitos resulta destas reações.²⁷

O crescente interesse dos consumidores por alimentos saudáveis constitui um desafio para as indústrias do setor alimentar. Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs a diminuição da ingestão recomendada de açúcares de 10% para 5% do total de calorias diárias.³⁰ Particularmente, as indústrias de biscoitos têm de procurar alternativas, uma vez que a diminuição da concentração de açúcar facilita o desenvolvimento do glúten e a gelatinização do amido, prejudiciais para a qualidade dos biscoitos. Várias alternativas à sacarose têm sido estudadas. Por exemplo, Savitha *et al.*³¹ avaliaram o efeito da substituição de açúcar por sucralose e maltodextrina. Os autores conseguiram obter biscoitos com propriedades reológicas e sensoriais semelhantes aos obtidos com açúcar. Kweon *et al.*³² estudaram o efeito da substituição da sacarose por isomaltulose ou por um xarope de glucose. Os biscoitos obtidos com isomaltulose pré-dissolvida apresentaram características desejáveis. Apesar destes resultados, serão ainda necessários mais estudos que permitam concluir acerca das moléculas e quantidades ideais para substituir a sacarose.

1.3. Segurança e Qualidade Alimentar

Alimentos contaminados com bactérias, vírus, fungos ou substâncias químicas nocivas podem ser a causa de múltiplas doenças, que variam desde diarreia até cancro. De facto, estima-se que 600 milhões de pessoas adoecem e 420 000 morrem por ano, devido à ingestão de alimentos contaminados. Além das consequências diretas na saúde pública, as doenças com origem alimentar têm também efeitos adversos no desenvolvimento socioeconómico, prejudicando o turismo e o comércio.³³ Estes aspetos destacam a importância da implementação de sistemas de Segurança e Qualidade na indústria alimentar que permitam garantir que os alimentos ingeridos não estão contaminados. De notar que os termos “segurança” e “qualidade” são dois conceitos diferentes. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO),³⁴ Segurança Alimentar refere-se a “todos os perigos que podem tornar os géneros alimentícios prejudiciais para a saúde do consumidor”, ou seja, visa a produção de alimentos sem agentes que possam provocar

doenças ou ferimentos. Por sua vez, Qualidade Alimentar inclui “todos os outros atributos que influenciam o valor de um produto para o consumidor. Isso inclui atributos negativos, como a deterioração, contaminação com lixo, descoloração, odores indesejáveis e atributos positivos, tais como a origem, cor, sabor, textura e o método de processamento dos alimentos.”

A IFS Food publicou em janeiro de 2012 a norma *IFS Food version 6 - Standard for auditing quality and food safety of food products*.³⁵ Esta norma tem como objetivo a construção de um forte sistema de segurança alimentar e gestão da qualidade para garantir que todos os requisitos de segurança e qualidade alimentar são cumpridos. Segundo esta norma, qualquer empresa alimentar deve ter implementado o sistema HACCP, baseado nos princípios do *Codex Alimentarius*.

O sistema HACCP tem como base uma metodologia preventiva, visando evitar potenciais riscos que podem causar danos aos consumidores, através da eliminação ou redução de perigos, garantindo que apenas alimentos seguros estão à disposição dos consumidores.³⁶ Trata-se, portanto, de uma estratégia sistemática para identificar, avaliar e controlar perigos, tendo como base a aplicação de princípios técnicos e científicos na produção e manipulação de géneros alimentícios, devendo ser aplicada ao longo de toda a cadeia alimentar.^{36,37} O sistema HACCP deve ser desenvolvido em todas as empresas do sector alimentar que se dediquem a qualquer fase de produção, transformação, armazenamento e distribuição de géneros alimentícios.³⁶ Deste modo, de acordo com o *Codex Alimentarius*, para a implementação de um plano HACCP devem ser considerados os seguintes princípios:³⁷

1. Elaborar análise de perigos: identificar e avaliar os perigos de acordo com a probabilidade de ocorrência e a severidade dos seus efeitos adversos à saúde. Estabelecer medidas de controlo a ser aplicadas.
2. Identificar os pontos críticos de controlo (PCC): identificar passos no fluxo de produção em que o controlo é fundamental para evitar ou eliminar um risco ou reduzir para níveis aceitáveis.
3. Estabelecer limites críticos para cada PCC: definir e validar os limites críticos para cada PCC, de modo a identificar claramente quando o processo não se encontra sob controlo.

4. Monitorizar cada PCC: estabelecer procedimentos de vigilância que permitam detetar perdas de controlo de cada PCC em tempo útil para aplicar medidas corretivas antes de ocorrer um desvio.
5. Estabelecer medidas corretivas: desenvolver medidas corretivas para cada PCC para lidar com desvios dos limites críticos.
6. Estabelecer procedimentos de verificação: estabelecer processos, a efetuar regularmente, para determinar se o sistema HACCP é eficaz.
7. Estabelecer documentação e registos de todo o sistema HACCP: elaborar documentos e registos adequados à natureza e dimensão das empresas, a fim de demonstrar a aplicação eficaz das medidas referidas nos princípios 1 a 6.

1.3.1. Perigos

Segundo o *Codex Alimentarius*, “perigo” refere-se a “um agente biológico, químico ou físico presente no alimento com potencial para causar efeitos nocivos para a saúde”.³⁷ Os perigos biológicos são os que representam maior risco à inocuidade dos alimentos.³⁸ Estes incluem microrganismos bacterianos, virais e parasitários. A maioria das doenças de origem alimentar confirmadas devem-se a bactérias patogénicas, como *Salmonella*, *Listeria* e *Enterohaemorrhagic Escherichia coli*.^{33,39} Estes perigos podem ser encontrados em quase todos os alimentos e, embora ocorram naturalmente no ambiente, a sua presença encontra-se geralmente associada aos operadores e matérias-primas.^{38,39} Grande parte dos perigos biológicos podem ser inativados por tratamento térmico adequado, eliminados por filtração ou mantidos em níveis controlados através do frio. No entanto, algumas espécies podem ser resistentes ao calor ou possuir formas de resistência que permitem a sua sobrevivência em ambientes adversos.^{39,40}

A presença de contaminantes químicos nos alimentos pode ser de ocorrência natural, isto é, quando os contaminantes não são adicionados intencionalmente ao alimento, ou por adição intencional.³⁹ Nos perigos químicos de origem natural incluem-se os contaminantes de origens industriais (ex: dioxinas e metais pesados), as toxinas produzidas por organismos vivos (ex: micotoxinas e biotoxinas marinhas), contaminantes resultantes do processamento alimentar (ex: acrilamida) e também alergénios.^{38,40} Os perigos químicos podem também decorrer da adição voluntária durante o processo, tais como aditivos alimentares, pesticidas, medicamentos veterinários, agentes de limpeza e de produtos que migram dos materiais em

contacto com os alimentos.⁴⁰ Metais pesados, como chumbo e cádmio, são também perigos químicos, podendo causar danos a nível neurológico e renal. Estes, podem contaminar os alimentos através da poluição ambiental, água e solo. Quando ingeridos em doses elevadas, os contaminantes químicos podem ser responsáveis por doenças súbitas de grande intensidade, mas se ingeridos em pequenas doses ao longo da vida podem também causar doenças crónicas.³⁹

Por último, os perigos físicos relacionam-se com a presença de objetos estranhos no alimento (ex: vidros, plásticos e metal) que possam causar doença ou lesão ao consumidor. Podem resultar de contaminação nas matérias-primas ou terem sido incorporados durante o processo em qualquer ponto da cadeia alimentar até ao consumidor.^{39,40}

1.3.2. Controlos de segurança e qualidade em biscoitos

As operações de controlo de qualidade devem incluir a pré-produção, produção e pós-produção. A fase de pré-produção envolve a inspeção das entregas de ingredientes e material de embalagem, a monitorização de materiais armazenados e as condições de higiene da fábrica. O controlo durante a produção envolve o processamento de materiais, medição, mistura, cozimento, refrigeração e manipulação dos biscoitos, e embalagem. No controlo de qualidade pós-produção efetua-se a inspeção do produto embalado, monitorização dos requisitos de armazenamento e de distribuição.⁴¹

1.3.2.1. Boas práticas de fabrico

As boas práticas de fabrico incluem aspetos de higiene das fábricas e segurança dos produtos, estando claramente relacionadas com o sistema HACCP. Os fatores que causam perigo para a saúde estão associados à decomposição de alimentos por bactérias e bolores, contaminações por animais (insetos, roedores, humanos), plásticos, vidros, detergentes e óleos minerais, entre outros. Portanto, a higiene é um aspeto de grande importância numa fábrica de biscoitos. Dos operadores podem surgir contaminações por cabelos, objetos/acessórios pessoais e por microrganismos presentes nas mãos, pelo que a utilização de adornos deve ser evitada e as regras básicas de higiene pessoal devem ser mantidas. Fardas apropriadas, utilizadas apenas dentro da fábrica, assim como instalações de higiene adequadas devem ser disponibilizadas pelas indústrias. Estas instalações devem estar separadas das zonas de fabrico. No final de cada ciclo de produção todos os equipamentos

devem ser limpos, de modo a evitar a acumulação de materiais atrativos para insetos. Os detergentes utilizados devem ser adequados e armazenados isoladamente. Outro aspeto que deve ser evitado é a utilização de objetos de vidro, uma vez que a quebra origina muitos fragmentos de reduzido tamanho difíceis de detetar, podendo causar ferimentos ou contaminar os biscoitos. Os edifícios devem ser mantidos em bom estado e devem ser aplicados métodos de exclusão de pragas. Ainda, a limpeza da caixa de carga do veículo de transporte dos alimentos deve ser assegurada.^{37,41}

1.3.2.2. Inspeção do produto final

Definir e testar todas as características que compõem um biscoito são tarefas exigentes. É, por conseguinte, necessário que os responsáveis pelo controlo de qualidade sejam sensíveis às variações que possam ocorrer no processamento, suscetíveis de afetar a qualidade do alimento.

Apesar dos sistemas de controlo tidos no decorrer do processo de fabrico, também os produtos finais têm de ser monitorizados. Controlar regularmente os teores de humidade, o peso e aparência das embalagens, as características organoléticas, as condições de armazenamento e também os equipamentos de deteção de metais, são formas de manter a qualidade e segurança e evitar a extensão de problemas. Embalagens com pesos superiores ou inferiores ao especificado podem indicar alterações na humidade, na textura ou no tamanho dos biscoitos, podendo comprometer a estabilidade da embalagem e tem também implicações na economia de produção. Os detetores de metais devem ser revistos regularmente para um correto desempenho. Quando necessária a utilização de luvas ou adesivos pelos operadores, estes devem ser detetáveis no detetor de metal, pelo qual passa a embalagem final.⁴¹ Uma estratégia a seguir para validar a qualidade e o sucesso do produto é a análise sensorial, a qual mede as respostas humanas ao produto em questão. A análise sensorial permite verificar se os aspetos como cor, sabor, textura, forma e tamanho dos biscoitos estão de acordo com os requisitos dos cliente e/ou consumidores. Existem vários tipos de testes de análise sensorial que podem ser utilizados, de acordo com o objetivo do teste. Os ensaios de discriminação são utilizados quando se pretende determinar se existe uma diferença entre dois ou mais produtos. Por sua vez, os ensaios descritivos consistem na identificação de atributos sensoriais específicos do produto. Estes dois tipos de ensaios devem ser realizados por um painel de provadores treinados, que atuam como um

instrumento. Os ensaios afetivos têm como objetivo medir as preferências e o grau de aceitação do produto e são realizados com os possíveis consumidores do produto em análise.⁴²

2. Trabalho realizado

2.1. Registo da temperatura e humidade das diferentes secções

Na Du Bois de la Roche é feito um registo diário da temperatura e da humidade relativa da secção de fabricação, da secção de embalagem e do armazém do produto final de modo a assegurar as características desejadas dos produtos e a manter a sua qualidade. Para tal é utilizado um termo-higrómetro, deixado cerca de 20 minutos em cada divisão. Embora a empresa não disponha de limites definidos para os valores de temperatura e humidade relativa das várias divisões, o registo destes parâmetros é útil para detetar a causa de possíveis falhas na qualidade dos produtos. A temperatura da sala de fabricação, onde ocorre a preparação das massas e os biscoitos adquirem o seu formato, é mantida próxima dos 18 °C. Temperaturas mais elevadas são evitadas, de modo a assegurar que durante a mistura a massa não atinge temperaturas muito elevadas que conduziria à perda de consistência. Nesta sala, a humidade relativa varia geralmente entre 57 e 72%. Na secção de embalagem registam-se temperaturas mais elevadas, usualmente acima dos 22 °C, devido à presença dos fornos. A temperatura do armazém, onde são armazenados os produtos finais prontos para o transporte, encontra-se próxima da temperatura ambiente e a humidade relativa pode variar entre 50 e 90%. As condições de temperatura e humidade no armazenamento dos biscoitos são muito importantes. Temperaturas elevadas podem levar à migração da gordura, tendo implicações no aspeto das embalagens e pode provocar sabor rançoso. Humidade elevada reduz a resistência das embalagens de cartão, facilitando a absorção de água pelos produtos, podendo afetar as características organoléticas.⁴³ Logo, os biscoitos devem ser armazenados em locais frescos e secos de modo a conservar as suas propriedades ao longo do tempo.

2.2. Controlo de pesagem

O Regulamento (UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011 é relativo à informação alimentar prestada aos consumidores, tendo sido a sua implementação obrigatória desde o dia 13 de dezembro de 2014. Este regulamento estabelece requisitos que regem a informação sobre os géneros alimentícios, em particular a

rotulagem, bem como meios para garantir que os consumidores tenham acesso a essa informação, aplicando-se aos operadores das empresas do setor alimentar em todas as fases da cadeia alimentar. Segundo este regulamento, é obrigatória a indicação da quantidade líquida do género alimentício e esta informação deve ser facilmente visível e claramente legível.⁴⁴

O registo de pesagem das embalagens deve ser mantido para mostrar a variação das massas ao longo da produção e a média, uma vez que têm implicações ao nível da eficiência de produção. No final da linha de produção, todas as embalagens são pesadas, antes de serem colocadas em caixas maiores para facilitar o seu transporte. As balanças são ajustadas para cada tipo de produto e embalagens com um peso inferior ao limite mínimo são automaticamente rejeitadas. A calibração das balanças é feita anualmente. Apesar deste controlo, também é feito um controlo de pesagem quando as caixas se encontram dispostas em paletes. Neste caso, apenas algumas caixas de cada palete são seleccionadas para registar o peso das embalagens que contêm. Este processo é feito diariamente para todos os tipos de biscoitos fabricados. O documento onde são anotadas as massas deve conter a designação do produto, o lote, a equipa de trabalho (turno) e a data de pesagem. Para efetuar o registo do peso líquido, o peso dos materiais da embalagem deve ser previamente determinado para ser subtraído ao peso total. Caso sejam encontradas embalagens com um peso inferior ao mínimo admissível, estas devem ser substituídas por outras que satisfaçam as condições exigidas. No final do registo as caixas voltam a ser colocadas na palete. Nesta etapa também se faz uma análise geral do aspeto da embalagem e da informação nela contida, de forma a verificar a sua nitidez e se coincide com a informação da etiqueta colocada na caixa.

2.3. Controlo destrutivo

O produto final deve ser inspecionado de forma a assegurar que as características dos biscoitos estão de acordo com os requisitos dos consumidores e que estas serão mantidas ao longo do transporte e distribuição. Para tal, algumas embalagens finais são recolhidas para avaliar parâmetros como dimensões, cor, sabor dos biscoitos e estanquicidade das embalagens de plástico (interiores ou exteriores), sendo por isso designado de controlo destrutivo. Tal como no controlo de pesagem, também na ficha de inspeção final deve constar a identificação do produto, a equipa de trabalho e a data de preenchimento.

No final do controlo destrutivo, as amostras são descartadas. No caso de se detetar alguma não conformidade, esta tem de ser registada e, se observada sucessivamente, toda a produção deve ser verificada.

2.3.1. Controlo da embalagem

O objetivo da embalagem é proteger os biscoitos de modo a que o sabor e aparência sejam preservados durante o armazenamento e distribuição. Portanto, a embalagem deve funcionar como uma barreira à humidade e à luz e proporcionar resistência a danos mecânicos. Assim sendo, é necessário ter em atenção que as embalagens estejam bem seladas. Por vezes, biscoitos com superfícies ásperas podem perfurar a embalagem provocando alterações organoléticas. A oxidação de lípidos, que pode resultar da exposição à luz e/ou ao oxigénio, origina rancidez, comprometendo a qualidade dos biscoitos. A humidade que passa da atmosfera para o interior da embalagem, quando esta se encontra em más condições, leva à perda de consistência e pode também provocar a deterioração do sabor e aparência dos biscoitos.⁴³ O controlo da estanquicidade das embalagens é feito diariamente pelos operadores, através da compressão manual de várias embalagens. Algumas embalagens finais são recolhidas para avaliar a estanquicidade através de um equipamento que injeta ar para o interior da embalagem através de uma agulha oca, aumentando a pressão, até a embalagem abrir. Os biscoitos podem também ser quebrados pela ação da máquina de empacotar ou por manuseio brusco depois de embalados, sendo rejeitados. Verificações de controlo de qualidade devem avaliar a dimensão e a natureza do problema.

A embalagem permite também fornecer informações obrigatórias aos consumidores como a denominação do género alimentício, a lista e quantidade de ingredientes, o peso, a data limite de consumo, as condições de conservação, o nome e o endereço da empresa e a declaração nutricional (valor energético).⁴⁴ Portanto, é necessário assegurar que a informação contida nas embalagens está correta e legível assim como o seu bom estado. Embalagens com informação errada ou com defeitos na impressão devem ser rejeitadas. Este controlo é feito por observação das embalagens de cada tipo de biscoito, tanto no decorrer da sua produção como no produto final.

2.3.2. Controlo das dimensões e teor de humidade dos biscoitos

As dimensões de todos os diferentes tipos de biscoitos produzidos na Du Bois de La Roche têm de ser registadas. A manutenção destes registos é importante para detetar variações e a sua extensão. Estas medições podem contribuir para efetuar pequenos ajustes em qualquer passo da fabricação ou mesmo para mudanças no processo, se variações excessivas forem verificadas regularmente. A forma, a espessura, o comprimento e a largura dos biscoitos são influenciados por vários aspetos, nomeadamente pela qualidade da massa, pelo peso da massa e pelas condições do forno. Biscoitos com dimensões superiores às esperadas podem causar implicações ao nível da embalagem. Biscoitos que ocupam maior área ou volume podem afetar a selagem das embalagens ou levar à quebra dos biscoitos, o que é incómodo para os consumidores. Para fazer esta análise algumas embalagens finais (no total cerca de 51 biscoitos) são recolhidas e a largura, comprimento e espessura de cada biscoito são determinadas pela utilização de um paquímetro. Os limites das dimensões variam de acordo com o produto.

Ao longo da produção, após saírem do forno e arrefecerem, o teor de humidade dos biscoitos é determinado de forma a verificar se apresentam um valor dentro do limite estabelecido. Caso os biscoitos apresentem um teor de humidade superior, têm de ser efetuados ajustes, essencialmente no forno, e os biscoitos não podem ser embalados. Apesar deste controlo, o produto final também é avaliado em termos do teor em humidade para averiguar a sua conformidade com os critérios estabelecidos pelos clientes. Para grande parte dos biscoitos o teor máximo de humidade é de 3%. Uma vez que a água tem um efeito plastificante, quanto maior for o teor de humidade dos biscoitos, menos estaladiços, o que não é desejável para os consumidores.⁴⁵ O teor de humidade é determinado através de um analisador de humidade, no qual são colocados cerca de 3g de pedaços de biscoito. Este processo é repetido para um mínimo de 5 biscoitos, para obter uma média. A calibração deste equipamento é feita anualmente.

2.3.3. Análise sensorial

Na análise sensorial dos biscoitos são avaliados parâmetros como a aparência, a cor, a textura e a aceitabilidade geral, verificando a conformidade com a aceitabilidade dos consumidores. A fim de avaliar a qualidade dos biscoitos, faz-se diariamente um controlo dos diferentes produtos fabricados depois de arrefecidos e embalados. O controlo das

características físicas, como forma, tamanho e aparência, está descrito no tópico anterior. Na ficha de inspeção final de cada produto, deve-se anotar se o sabor e a cor dos biscoitos analisados se encontram satisfatórios ou não. Isto é feito por observação e prova dos biscoitos, fazendo-se também uma apreciação global. Em geral, biscoitos com uma cor demasiado escura ou clara devem ser rejeitados, uma vez que tanto o sabor como a textura podem estar alterados. Usualmente, biscoitos muito escuros quebram facilmente, ao passo que biscoitos claros adquirem uma textura macia.

2.4. Detetor de metais

A contaminação por metais constitui um perigo físico que pode implicar lesões no consumidor. Deste modo, a deteção de metais é um passo fundamental do controlo de qualidade e segurança dos géneros alimentícios, pelo que constitui um PCC. Dado o contacto das massas e dos biscoitos com equipamentos metálicos, estão presentes no final da linha de empacotamento detetores de metais, junto aos controladores de peso. Com estes detetores espera-se que embalagens que contenham biscoitos contaminados sejam rejeitadas e isoladas dos outros produtos. Visto que o objetivo é a prevenção, a deteção de metais envolve posteriormente uma pesquisa dos fragmentos e a identificação da fonte para que medidas destinadas a evitar novos casos possam ser implementadas. O controlo do bom funcionamento dos aparelhos é feito diariamente e passa pelo uso de padrões de metais ferrosos e não ferrosos, fazendo-os passar pelo detetor, a fim de averiguar se são ou não rejeitados.

Capítulo II – Análise de hidrocarbonetos de óleos minerais em alimentos

1. Introdução

1.1. Hidrocarbonetos de óleos minerais

Vários produtos para uso humano são obtidos a partir de petróleo bruto, nomeadamente através de processos de destilação.⁴⁶ A nomenclatura e classificação científica do petróleo provoca alguma incerteza e confusão. O petróleo tem vindo a ser designado como mineral, embora esta designação não satisfaça a definição comum de um mineral como uma substância inorgânica. Devido à sua associação com as rochas, o petróleo é incluído nos recursos minerais, sendo por isso frequentemente indicado como combustível mineral.⁴⁷ Os hidrocarbonetos de frações pouco voláteis do petróleo, obtidas por destilação do petróleo bruto, são vulgarmente designados por hidrocarbonetos de óleos minerais (MOH).⁴⁸ Os MOH são misturas complexas de hidrocarbonetos contendo entre 10 e cerca de 50 átomos de carbono. Os MOH podem ser divididos em hidrocarbonetos saturados (MOSH) e hidrocarbonetos aromáticos (MOAH). Os MOSH podem ainda ser subdivididos em parafinas (alcanos lineares ou ramificados) e naftenos (os cicloalcanos). Os MOAH incluem na sua estrutura um ou mais anéis de benzeno e encontram-se geralmente alquilados (Figura 2). Estes diferem dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) formados durante a combustão ou tratamento térmico, encontrados em alimentos fumados ou assados que, tipicamente, não são alquilados.^{46,49} Os óleos minerais estão amplamente presentes no ambiente e a contaminação de alimentos por produtos e óleos minerais representa uma importante ameaça para os consumidores.⁵⁰

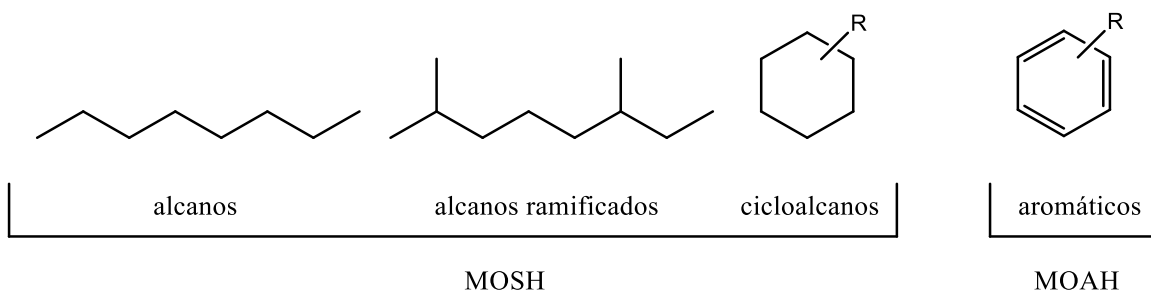


Figura 2 – Exemplos das diferentes classes de hidrocarbonetos presentes no petróleo.

1.2. Fontes de contaminação

Os alimentos podem ser contaminados com MOH em diversas fases do processamento e por inúmeras fontes, sendo as mais relevantes a contaminação ambiental, os óleos minerais usados na indústrias alimentares e a migração a partir dos materiais em contacto com os alimentos.^{46,50} A composição dos MOH é muito variável. Existem óleos de qualidade alimentar ou brancos (ausência de MOAH), mas a maioria contém entre 10 e 30 % de MOAH. A massa molecular também varia numa ampla gama, desde diluentes voláteis até óleos lubrificantes, influenciando o modo como os MOH contaminam os alimentos. As contaminações podem ocorrer em fase gasosa, restritas a hidrocarbonetos com volatilidade suficiente, ou por contacto direto, não influenciado pela volatilidade.⁴⁸

Como referido acima, as matérias-primas podem sofrer contaminação ambiental. Os principais contaminantes presentes no ar provêm dos gases de escape dos veículos, do fumo dos combustíveis e de resíduos de pneus e das estradas, sendo por vezes designado por “contaminação de fundo”.⁴⁸ Neukom *et al.*⁵¹, comparando as parafinas minerais presentes em plantas e em alimentos de origem vegetal com as presentes no ar, concluíram que havia correspondência e que a contaminação poderia ter origem no asfalto, em óleos lubrificantes e em resíduos de gasóleo. Grundböck *et al.*⁵² analisaram o nível de contaminação por MOSH em sementes de girassol colhidas manualmente ou por meios mecânicos. As sementes colhidas manualmente apresentaram menor nível de contaminação, sendo esta contaminação principalmente devida a óleos lubrificantes presentes na atmosfera (contaminação ambiental). Para a maioria das sementes colhidas por métodos mecânicos, os óleos de combustão e lubrificação utilizados nas ceifeiras foram os principais contaminantes.

Os alimentos processados também podem ser contaminados por óleos minerais, amplamente empregues na indústria alimentar. Os agentes antiaderentes são muito utilizados na indústria de panificação e pelos fabricantes de doces para evitar a aderência dos alimentos às superfícies. Todavia, estes agentes contêm MOH que migram para os alimentos, contaminando-os.^{49,53} Óleos minerais altamente refinados podem também ser utilizados como agentes de remoção de pó durante o transporte e armazenamento de grãos.⁴⁸ Uma grande variedade de óleos usados em equipamentos contamina os alimentos, como os óleos lubrificantes aplicados em vários tipos de máquinas que podem derramar para os alimentos.^{48,52}

Os materiais em contacto com os alimentos são também uma importante fonte de contaminação por MOH. Neste caso, além de contacto direto ou em fase gasosa, a contaminação pode também ocorrer por permeação, isto é, quando existe uma embalagem interna.⁴⁸ As embalagens de cartão representam uma importante via de exposição dos alimentos aos MOSH e MOAH, principalmente quando são usadas fibras recicladas ou tintas de impressão à base de óleos minerais.⁵⁴ As tintas de impressão utilizadas para imprimir as embalagens dos produtos contêm entre 25 e 50% de óleos minerais utilizados como solventes dos pigmentos e que são absorvidos pelas fibras. Contudo, esses MOH são voláteis, evaporando lentamente para o exterior ou para os alimentos embalados.⁵⁵ Em 2010 foi verificada a utilização de tintas de impressão contendo óleos minerais, sendo presumível que a maioria dos MOH transferidos das embalagens de cartão para os alimentos provenha dessas tintas.⁵⁶ O papel ou cartão reciclados contêm uma mistura de óleos minerais provenientes das tintas de impressão, ceras e colas aplicadas em jornais e outros papéis.⁵⁵ Vollmer *et al.*⁵⁶ observaram que a concentração de MOSH nos alimentos embalados com cartão reciclado é 76% superior à verificada nos alimentos embalados com cartão não reciclado. Nesse mesmo estudo, constatou-se que a utilização de embalagens internas de papel e/ou polietileno não contribuem para a redução da migração. Deste modo, tem vindo a ser estudado o desenvolvimento de barreiras funcionais que retardem ou impeçam a migração de MOH para os alimentos. Por exemplo, uma barreira de álcool polivinílico, ou uma multicamada de poliéster, polietileno e copolímero de etileno e acrilato de metilo, ou ainda carvão ativado incorporado mostraram ser eficazes no retardamento da migração de MOSH e MOAH para os alimentos.⁵⁷

1.3. Toxicidade

As vias de exposição mais estudadas para hidrocarbonetos saturados e aromáticos são a inalação, a aplicação cutânea e a ingestão.^{46,48} A toxicidade dos óleos minerais depende do peso molecular dos hidrocarbonetos e da presença de MOAH, uma vez que esta representa a fração mais tóxica. De facto, os óleos minerais obtidos de produtos petrolíferos não refinados podem conter grandes quantidades de hidrocarbonetos aromáticos, sendo classificados como cancerígenos para os seres humanos.^{48,58}

Num estudo realizado por Scotter *et al.*⁵⁹ constatou-se que ratos tratados com um consumo médio de 2049 mg/kg por dia de cicloalcanos, durante 28 dias, apresentam

histiócitos (conjunto de macrófagos) nos gânglios linfáticos mesentéricos. Alterações histopatológicas no fígado foram apenas observadas após 90 dias de tratamento. Smith *et al.*⁶⁰ avaliaram os efeitos histopatológicos em ratos (fêmeas) alimentados com óleos minerais durante 90 dias. No fígado observou-se o desenvolvimento de granulomas (conjunto de macrófagos cercados por células inflamatórias, células necróticas ocasionais e fibrose variável) e microgranulomas (pequeno conjunto de macrófagos com alguns linfócitos periféricos), tendo-se determinado um nível de efeito adverso não observado (NOAEL) de 190 mg/kg para os MOSH com um número de átomos de carbono entre 15 e 37. Estes mesmos hidrocarbonetos induziram a formação de histiócitos nos gânglios linfáticos mesentéricos, constatando-se um valor de NOAEL de 2 mg/kg ou inferior. Hidrocarbonetos parafínicos de óleos minerais com um número de átomos de carbono entre 27 e 45, não induziram quaisquer efeitos histopatológicos (NOAEL de 1951 mg/kg). Ainda neste estudo verificou-se uma atenuação dos efeitos hepáticos após 28 dias sem tratamento. Esta atenuação foi ainda mais evidente após 85 dias, apesar de ainda ser visível a presença de microgranulomas. Os resultados obtidos nestes estudos mostram que os histiócitos ocorrem para doses de MOH inferiores aos microgranulomas hepáticos, tal como tinha sido verificado anteriormente por Baldwin *et al.*⁶¹ que, num estudo realizado com ratos, estabeleceram para MOSH um NOAEL de 0,93 mg/kg e 46 mg/kg em histiócitos nos gânglios linfáticos mesentéricos e granulomas hepáticos, respetivamente. Em 1987, Salvayre *et al.*⁶² reportaram o caso de um homem de 55 anos que faleceu devido a fibrilação ventricular causada por insuficiência coronária. Foram encontrados micronódulos nas áreas pulmonares axilares e apicais. Exames realizados revelaram a presença de granulomas gigantes contendo inclusões cristalinas de um material que se dissolveu em solventes orgânicos. Na análise lipídica de vários tecidos foram detetadas elevadas concentrações de alcanos (C₂₉ e C₃₁). Os autores concluíram que a ingestão alimentar era responsável pela presença dos alcanos no corpo, que foram absorvidos no intestino, transportados pelo ducto linfático e captados por células macrofágicas nos órgãos. Em 2014, Barp *et al.*⁶³ estudaram a presença de óleos minerais em tecidos humanos, tendo verificado que um quarto dos indivíduos tinham uma quantidade total de MOSH no corpo acima de 5 g. Apesar de não terem sido detetados MOAH, a verificação de acumulação de MOSH em tecidos humanos solicita uma avaliação toxicológica cuidada destes compostos.

Dado que não é possível definir uma dose segura para estes compostos e uma vez que não existem dados suficientes sobre a sua acumulação, não foram especificados, até agora, valores de ingestão diária tolerável (TDI) para MOSH nem para MOAH.

1.4. Genotoxicidade e carcinogenicidade

Shoda *et al.*⁶⁴ avaliaram o potencial carcinogénico de uma mistura de óleos minerais parafínicos, incorporando-os na dieta de ratos em doses de 2,5 e 5%, durante dois anos. Constatou-se, no final do estudo, que a massa corporal dos machos aumentou no grupo submetido à concentração mais elevada estudada (1941,9 mg/kg de massa corporal). Neste mesmo grupo, verificou-se um aumento significativo do peso do fígado e dos rins comparativamente ao grupo controlo. Em todos os grupos testados (machos e fêmeas) foram encontrados tumores em vários órgãos, mas não houve diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo. Num outro estudo,⁶⁵ foram tratados ratinhos por aplicação tópica com 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno (iniciador tumoral), seguido por aplicação repetida de pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano), octadecano, tetracosano e octano. Os animais foram observados para o aparecimento de papilomas, tendo-se verificado que o pristano foi o promotor tumoral mais potente. LaVoie *et al.*⁶⁶ avaliaram o potencial carcinogénico de hidrocarbonetos aromáticos alquilados (derivados alquilados de antraceno). Os compostos foram aplicados na pele de ratos e, após a fase de iniciação, foi aplicado 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato, um promotor tumoral. O aparecimento de tumores cutâneos nos ratos tratados com antraceno, 1-, 2- e 9-metilantraceno e 2,9-dimetilantraceno não foi significativamente diferente do grupo controlo. Os tratamentos com 9,10-dimetilantraceno, 2,9,10-trimetilantraceno e 2,3,9,10-tetrametilantraceno resultaram num aumento significativo da incidência de tumores. Os resultados destes estudos mostram que, em geral, quando os compostos derivados de petróleo podem ser agentes cancerígenos, este efeito parece ser devido à presença de PAH.

A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) publicou, em 2012, a *Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food*, realçando que os MOSH se podem acumular nos tecidos humanos e originar microgranulomas e que os MOAH podem ser mutagénicos e cancerígenos.⁴⁸ Contudo, não existe ainda uma avaliação aprovada sobre os MOAH.

1.5. Legislação

Em 1995, o Comité Europeu Científico da Alimentação (SCF) avaliou a segurança de hidrocarbonetos de óleos minerais e ceras para uso como aditivos alimentares, no processamento de alimentos e em materiais de embalagens de alimentos. Para ceras altamente refinadas e com um número de átomos de carbono superior a 25, foi estabelecida uma ingestão diária admissível (ADI) de 0-20 mg/kg de massa corporal. Aos óleos minerais parafínicos com um número de átomos de carbono superior a 25 foi atribuído um valor de ADI temporário de 0-4 mg/kg de massa corporal.⁶⁷ Em 2002, o Comité Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) analisou estudos sobre os efeitos tóxicos e cancerígenos de óleos minerais.⁶⁸ Com a exceção dos óleos minerais parafínicos de elevada e média viscosidade, conclui-se que a acumulação de óleos minerais nos tecidos provoca efeitos inflamatórios indicadores de uma reação à presença de um corpo estranho. Para óleos minerais de elevada viscosidade foi estabelecida uma ADI de 0-20 mg/kg de massa corporal e para os de média e baixa viscosidade de 0-10 mg/kg de massa corporal. Um valor temporário de ADI de 0,01 mg/kg foi estabelecido para os cicloalcanos. No entanto, em 2012 este valor foi retirado, sendo necessária uma revisão. Em 2009 o Painel dos Aditivos Alimentares e Fontes de Nutrientes Adicionados aos Alimentos (Painel ANS) avaliou a segurança dos óleos minerais brancos de alta viscosidade, tendo estabelecido uma ADI de 12 mg/kg de massa corporal.⁶⁹ Este valor substituiu o atribuído anteriormente pelo SCF a óleos parafínicos brancos (0-4 mg/kg).

Em 2011, o Instituto Federal Alemão de Avaliação de Riscos (BfR) concluiu que a transferência de hidrocarbonetos saturados com uma cadeia de carbono de C₁₀ a C₁₆ para os alimentos não deve ultrapassar 12 mg/kg. Além disso, foi estabelecido um limite de 4 mg/kg de alimento para MOSH de C₁₆ a C₂₀.⁷⁰ Em maio de 2013, o Ministério Alemão da Nutrição, Agricultura e Defesa do Consumidor publicou uma proposta de regulação dos contaminantes de óleos minerais em materiais em contacto com os alimentos, declarando que não deveria ocorrer migração de óleos minerais (números de átomos de carbono entre 10 e 25) de papel e cartão para alimentos.

Finalmente, em julho de 2014, um novo projeto estabeleceu limites máximos para resíduos de óleos minerais em embalagens de alimentos feitas de fibras recicladas. Foi estabelecido um limite máximo para MOSH (24 mg/kg) e para MOAH (6 mg/kg) numa gama C₁₆ – C₂₅ (contacto com alimentos secos) ou C₁₆ – C₃₅ (contacto com alimentos

húmidos). Quando os limites máximos nos materiais de embalagem forem excedidos, esta pode ainda ser colocada no mercado se os valores de migração para alimentos não excederem 2 mg/kg para MOSH e 0,5 mg/kg para MOAH (citado em 46).

O Regulamento (CE) n.º 1935/2004 estabelece as disposições e princípios gerais aplicáveis aos materiais e objetos destinados a entrar em contacto com alimentos.⁷¹ Não existem medidas específicas relativas aos óleos minerais, com exceção das disposições relativas à sua utilização como aditivos em materiais plásticos e artigos destinados a entrar em contacto com os alimentos estabelecidas pelo Regulamento (UE) n.º 10/2011.⁷² Os seguintes óleos minerais são abrangidos pela lista de aditivos: ceras parafínicas, refinadas, derivadas de hidrocarbonetos petrolíferos ou sintéticos, de viscosidade baixa, foram definidas com um limite de migração específico de 0,05 mg/kg de alimento e não devem ser utilizadas para objetos em contacto com alimentos gordurosos; para ceras refinadas, derivadas de hidrocarbonetos petrolíferos ou sintéticos, de viscosidade elevada e óleos minerais brancos, parafínicos, derivados de hidrocarbonetos petrolíferos, não foram definidos limites de migração específicos.

1.6. Método de análise

A análise de contaminantes nos alimentos é uma tarefa desafiante, principalmente devido à elevada complexidade das matrizes e baixas quantidades desses compostos. No caso de contaminantes ubíquos, como é o caso dos MOH e PAH, deve-se ter particular atenção para evitar o risco de contaminação cruzada em todos os passos analíticos.⁴⁶

1.6.1. Preparação da amostra

Os MOH são contaminantes lipofílicos, solúveis em solventes apolares e, portanto, a extração ocorre com solventes apolares, como o hexano. O método de extração mais adequado depende das características da amostra a analisar. Óleos vegetais, por exemplo, são completamente solúveis em solventes orgânicos e não necessitam de um passo de extração. No entanto, devido à presença de compostos interferentes (triglicerídeos, olefinas, alcanos naturais), os óleos vegetais são matrizes difíceis para análise de MOH. Com o objetivo de eliminar interferências, têm sido propostas diferentes abordagens (tópico 1.6.3.). A extração de cartão, por sua vez, exige condições mais específicas. Uma vez que o papel reciclado contém hidrocarbonetos de elevada massa molecular que não migram para os

alimentos, geralmente as condições são ajustadas para os discriminar.⁷³ Nas amostras de cartão a extração ocorre por imersão em etanol/hexano (1:1) à temperatura ambiente durante 2 horas.^{56,73} Amostras sólidas podem ser convertidas em pó, se necessário, para aumentar o contacto com o solvente durante a extração, que ocorre *overnight* à temperatura ambiente.^{46,56} No entanto, em alguns casos, para uma extração completa dos MOH pode ser necessário mais do que um passo de extração e as amostras podem ser submetidas a elevadas temperaturas.⁷³ Em alternativa à extração por solvente, foi mais recentemente proposto o método de extração por líquido pressurizado, utilizando como solvente o hexano ou hexano/etanol 1:1. Esta técnica explora o poder de extração melhorado de um solvente levado a alta temperatura sob pressão, o que permite uma extração rápida e minimizar o consumo de solventes e a manipulação da amostra.⁷⁴

1.6.2. Determinação analítica

A cromatografia gasosa (GC) é a técnica de separação de eleição, pois permite a caracterização de MOSH e a separação destes dos hidrocarbonetos naturalmente presentes nos alimentos. Os alimentos de origem vegetal contêm naturalmente hidrocarbonetos saturados, compostos principalmente de alcanos lineares com um número de átomos de carbono ímpar, originários de ceras vegetais. Estes formam picos bem definidos e isolados, ao contrário dos MOSH que formam uma ampla protuberância de componentes não resolvidos. Os produtos vegetais podem também conter olefinas, carotenóides e outras substâncias, que podem eluir juntamente com a fração de MOAH. No entanto, como formam picos bem definidos podem ser reconhecidos e separados dos MOAH. Contudo, em certos alimentos (óleos alimentares e gorduras) estas substâncias podem estar presentes em elevadas quantidades, sobrecarregando o cromatograma.⁷³ Apesar das características da GC, esta técnica não é seletiva, sendo necessária uma pré-separação para excluir a interferência por outros compostos que podem ser confundidos com MOH.⁴⁹

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à cromatografia gasosa, designado *online* HPLC-GC, utilizado para a análise de óleos minerais em alimentos foi descrito pela primeira vez em 1991.⁷⁵ Este método proporciona uma pré-separação de elevada resolução, permite a análise totalmente automatizada e também a eliminação de grande parte das contaminações durante o processo analítico.⁴⁹ A HPLC permite a remoção de material interferente e a separação dos MOSH e dos MOAH, contribuindo para baixar os

limites de detecção, podendo também ser útil para GC com detetores não seletivos, como o detetor de ionização de chama (FID). A análise de óleos minerais por *online* HPLC-GC ocorre principalmente por HPLC de fase normal.⁷³

A determinação do teor de óleos minerais em alimentos é um procedimento particularmente exigente, dado que envolve uma mistura complexa de compostos. Embora a espectrometria de massa (MS) seja mais sensível que o FID, este é o detetor mais utilizado para determinar MOH nos alimentos. O FID fornece praticamente a mesma resposta por unidade de massa para todos os hidrocarbonetos, permitindo determinar a soma dos hidrocarbonetos e evita problemas de calibração.^{48,73}

Até 2009 a técnica *online* HPLC-GC-FID era apenas utilizada para a análise de MOSH. Biedermann *et al.*⁴⁹ desenvolveram um método HPLC-GC-FID rápido, tornando viável análises de rotina de MOSH e MOAH em alimentos. A separação de MOSH e MOAH foi realizada por HPLC com uma coluna com 25 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno com gel de sílica, usando um gradiente inicial com hexano, atingindo 30% de diclorometano. Para conseguir uma separação completa dos MOSH e dos MOAH foi escolhido um gel de sílica com elevado poder de retenção para os MOAH. A coluna tem também a capacidade de reter lípidos (aproximadamente 20 mg) na parte superior, ocorrendo a separação dos MOH na parte inferior, que permanece ativa. A separação dos MOH foi verificada através de padrões marcando as extremidades das frações. O 5- α -colestano foi utilizado como marcador do final da fração MOSH, enquanto que o 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno e o perileno marcaram o início e o fim da fração MOAH, respetivamente. Além destes padrões, o ciclo-hexilciclo-hexano é geralmente utilizado como padrão interno e o pentilbenzeno utilizado para avaliar perdas de voláteis.⁷³ Para a GC foi utilizada uma fase estacionária de dimetilpolisiloxano e a temperatura aumentou de 65 °C para um máximo de 350 °C (20 °C/min). O método *online* HPLC-GC-FID é seletivo e permite a análise direta de MOSH e MOAH, pelo que foi posteriormente utilizado em vários estudos ou serviu como base para métodos semelhantes, tanto para análises em alimentos como em outras matrizes.^{57,76,77} Mais recentemente, Lommatzsch *et al.*⁷⁸ desenvolveram um método *online* HPLC-HPLC-GC que permite a divisão entre hidrocarbonetos saturados, monoinsaturados e aromáticos em materiais de embalagem e em alimentos. Numa primeira coluna com gel de sílica os hidrocarbonetos saturados e monoinsaturados são separados dos aromáticos. Na segunda coluna com gel de sílica impregnada com iões de prata ocorre a separação entre

olefinas e hidrocarbonetos saturados. Os hidrocarbonetos aromáticos, saturados e monoinsaturados são transferidos sequencialmente para a GC. Este método permite uma análise simples de hidrocarbonetos agrupados por espécies saturadas, monoinsaturadas e aromáticas, sendo uma ferramenta útil na análise de plásticos e outros produtos feitos de poliolefinas, e também para caracterizar os hidrocarbonetos que contaminam alimentos. Em 2016, Zoccali *et al.*⁷⁹ descreveram um método multidimensional para a determinação de MOH em óleos alimentares. Duas colunas de sílica (LC) são utilizadas para reter a maior parte dos lípidos e permitir a separação dos MOSH e MOAH, seguidas por uma coluna com iões de prata capaz de reter olefinas interferentes. Ainda, a utilização de detecção dupla, por FID e MS, possibilita quantificar a contaminação da amostra e confirmar a origem petrogénica dos MOH, por avaliação da presença de marcadores específicos.

A cromatografia gasosa bidimensional (GC × GC) é a técnica mais adequada para obter uma caracterização detalhada de misturas complexas de hidrocarbonetos.⁸⁰ Contudo, esta técnica não permite uma separação completa dos MOSH e MOAH, uma vez que os hidrocarbonetos nafténicos eluem juntamente com os componentes aromáticos alquilados. Portanto, a pré-separação por LC é um requisito para a caracterização dos MOAH. Biederman e Grob⁸¹ utilizaram o método de GC × GC para caracterizar os MOAH pelo número de anéis e grau de alquilação, utilizando uma fase estacionária apolar na primeira dimensão e uma polar na segunda. No entanto, para outras aplicações o contrário pode ser mais eficaz.⁸⁰

1.6.3. Métodos auxiliares

O método *online* HPLC-GC é o mais utilizado para a determinação de MOH, no entanto pode não ser suficiente, seja pela presença de material interferente que não é removido ou por elevados teores de gordura da amostra. Nestes casos, certos procedimentos adicionais podem ser utilizados. Alguns alimentos de origem vegetal podem conter alcanos naturais em quantidades muito elevadas, levando a uma sobrecarga do cromatograma impedindo a detecção dos MOSH. Estes alcanos de cadeia longa são retidos por óxido de alumínio ativado a cerca de 400 °C quando utilizados eluentes como pentano ou hexano.⁸² Para a análise de óleos alimentares ou alimentos ricos em gordura, devem também ser aplicados passos adicionais, visto que a coluna cromatográfica tem capacidade limitada para reter gordura. A saponificação pode ser utilizada para eliminar gordura em todos os tipos de

alimentos, no entanto implica um elevado gasto de solventes e é um processo demorado.⁷⁷ Moret *et al.*⁷⁷ descreveram um procedimento de saponificação assistida por microondas que ocorre em simultâneo com a extração, a 120 °C durante 20 min. Este procedimento permite uma rápida extração com mínima manipulação da amostra e com baixo consumo de solvente. Fiselier e Grob⁸³ exploraram as propriedades de adsorção de gel de sílica ativado para reter gordura. Com o objetivo de avaliar a contaminação por MOSH em óleos e sementes de girassol, propuseram a utilização de 7 g de gel de sílica ativado entre 400 e 600 °C, numa coluna de LC, para reter 1 g de gordura. Neste mesmo estudo foi utilizado óxido de alumínio para reter os alcanos naturais. As olefinas estão também presentes naturalmente e podem prejudicar a análise de MOAH. A epoxidação pode ser utilizada, de forma a converter as olefinas em derivados mais polares, aumentando o seu tempo de retenção.⁴⁹

1.7. Hidrocarbonetos de óleos minerais em alimentos

Os alimentos são contaminados por produtos de óleos minerais oriundos de diversas fontes. Dado que estes produtos podem causar efeitos adversos na saúde dos consumidores, torna-se importante avaliar o nível de contaminação dos alimentos e também detetar as fontes da contaminação.

Em 1991, Grob *et al.*⁵³ aplicaram um método LC-GC para determinar a contaminação de alimentos por óleos lubrificantes e agentes antiaderentes. Uma amostra de pão foi analisada, tendo-se verificado que a cêdea superior do pão e a parte central originaram cromatogramas praticamente vazios (< 1 mg/kg de MOSH). Por sua vez, na cêdea inferior obteve-se uma concentração de 10 mg/kg de parafinas, o que indica que foram utilizadas como agente antiaderente. Também foram analisados bombons, tendo-se constatado que quando triturados até formar pó estes apresentaram uma concentração de 1000 mg/kg de material de óleos minerais. Porém, quando a extração ocorreu com bombons intactos apenas foram encontrados 5 mg/kg de produtos de óleos minerais. Isto indica que as parafinas estavam presentes antes da moldagem dos bombons. Fiselier e Grob⁸³ avaliaram a contaminação de óleos de girassol, utilizando o método *online* HPLC-GC-FID, no qual a coluna de LC foi preenchida com gel de sílica e óxido de alumínio, removendo interferências e diminuindo assim o limite de deteção. Nos óleos extraídos de sementes colhidas manualmente as concentrações de MOSH variaram entre 0,14 e 0,77 mg/kg. Os óleos extraídos de sementes colhidas por meios mecânicos continham 3,3 – 9,3 mg/kg de MOSH.

As concentrações de MOSH em amostras de óleo refinado são superiores e encontram-se entre 2,7 e 32 mg/kg. Estes dados indicam, tal como no estudo anterior, que ocorre contaminação durante o processamento dos alimentos. Ainda num outro estudo, realizado por Biederman *et al.*⁴⁹, foram determinadas as concentrações de MOH em azeite refinado. Verificou-se que estava contaminado com 21 mg/kg de MOSH e 4 mg/kg de MOAH, sugerindo que o óleo mineral continha cerca de 20% de compostos aromáticos, típico de óleos utilizados em equipamentos mecânicos. Uma amostra de chocolate também foi analisada, apresentando uma concentração de 30 mg/kg de óleo mineral. Moret *et al.*⁷⁷ analisaram vários produtos à base de cereais. Foram analisadas várias amostras de pão, embalados em caixas de cartão e/ou em filmes de plástico, que apresentaram vários níveis de contaminação (as concentrações de MOSH até C₂₅ variam entre 0,7 e 26,4 mg/kg) de diferentes fontes. Em particular, a amostra mais contaminada apresentou uma concentração de MOSH com um número de átomos de carbono entre 25 e 45 de 20,7 mg/kg e não foram detetados MOAH. Contudo, cerca de metade das amostras continham MOAH (máximo de 2,2 mg/kg), numa gama típica dos óleos minerais que migram de embalagens feitas de fibras recicladas. Os biscoitos analisados, cuja maioria vinha embalado em contacto com filmes de plástico ou alumínio, continham níveis de contaminação entre 0,9 e 10,5 mg/kg de MOSH (até C₂₅). Apenas na amostra mais contaminada (com embalagem secundária de cartão reciclado) foram detetados 0,3 mg/kg de MOAH. Os autores constatarem a presença de óleo de palma utilizado como ingrediente, podendo ter sido este o responsável por parte da contaminação de MOSH encontrada. A contaminação por MOSH em bolos variou entre 1,0 e 19,9 mg/kg. Biederman e Grob⁷⁶ avaliaram a contaminação de alimentos por óleos minerais presentes em cartão reciclado. Foi assumido que os óleos minerais detetados eram praticamente exclusivos das embalagens de cartão reciclado. Para a realização deste estudo, arroz foi armazenado durante 8 meses numa caixa de cartão reciclado. Constatou-se que houve migração de 63% do óleo mineral (até C₂₈) para a amostra. No total, o arroz continha 15,4 mg/kg de MOSH e 4,0 mg/kg de MOAH. Os mesmos autores realizaram um estudo sobre a caracterização de óleos minerais por GC × GC, detetando concentrações mais baixas de MOSH (6,3 mg/kg) e de MOAH (2,2 mg/kg) em arroz embalado em saco de plástico.⁸⁰ Os autores concluíram que sacos de juta ou sisal foram a fonte da contaminação.

Os resultados dos estudos apresentados alertam para a necessidade de definir e limitar rigorosamente o uso de óleos minerais nas indústrias. Uma vez que os alimentos podem ser

contaminados em vários passos do fabrico, desde as matérias-primas até ao embalamento, podendo conter níveis de contaminação acima da aceitabilidade, torna-se fundamental haver restrições na utilização de óleos minerais. Devem ser estudadas formas de evitar a contaminação dos alimentos e as boas práticas de fabrico devem ser adaptadas nesse sentido.

1.8. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo inicial avaliar a presença de MOH em amostras de açúcar e arroz, disponíveis no mercado português. Para tal, utilizou-se a técnica de GC-MS para a identificação e quantificação dos contaminantes. A contaminação por oleato de glicidilo (OG) e palmitato de glicidilo (PG) também foi analisada. Os ésteres de glicidol e de ácidos gordos, também designados ésteres de glicidilo (figura 3) são contaminantes formados durante a refinação de óleos vegetais. Estes compostos formam-se durante o aquecimento do diacilglicerol ou monoacilglicerol sob condições de elevada temperatura durante o processo de desodorização.⁸⁴ Em 2016, a EFSA emitiu uma opinião científica sobre os ésteres de glicidilo, tendo concluído que estes são hidrolisados no trato gastrointestinal e que o glicidol é absorvido após a ingestão. Nesta mesma publicação concluiu-se que o glicidol é um composto genotóxico.⁸⁵ Em 2000 o glicidol foi classificado pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC) como “provavelmente cancerígeno para humanos”.⁸⁶

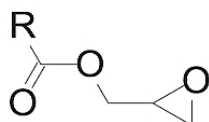


Figura 3 – Estrutura de um éster de glicidol e de ácido gordo (R – cadeia do ácido gordo).

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Os alimentos (1 embalagem de 1000 g de arroz agulha, 1 embalagem de 500 g de arroz basmati e 1 embalagem de 1000g de açúcar branco) foram comprados num hipermercado.

2.2. Produtos químicos e soluções

O hexano foi adquirido à Fisher Scientific e o tolueno à Panreac Quimica. Os alcanos, octadecano (C₁₈), tetracosano (C₂₄) e triacontano (C₃₀), são da Supelco. O ciclo-hexilciclo-hexano (Cycy), o pentilbenzeno (PB) e o palmitato de metilo (PM) foram obtidos da Sigma. O 2-etilnaftaleno (2-EN) é da Fluka e o perileno (Per) da Acros Organics. As soluções stock dos padrões individuais foram preparadas em balões volumétricos; para os padrões de MOSH: C₁₈ (1,56 mg/ml), C₂₄ (1,08 mg/ml), C₃₀ (0,98 mg/ml); de MOAH: PB (1,04 mg/ml), 2-EN (0,99 mg/ml), Per (1,0 mg/ml); para o PM (8,39 mg/ml) e para o padrão interno (PI), Cycy (1,04 mg/ml), em tolueno.

2.2.1. Testes de recuperação

Para a realização dos testes de recuperação foram preparadas seis soluções padrão, a partir das soluções stock anteriores, cujas concentrações finais são apresentadas na tabela 1. Da solução de PI foram adicionados 250 µl a todas as soluções e os balões volumétricos foram preenchidos com tolueno até 10 ml. Os volumes adicionados para cada solução padrão e as retas de calibração obtidas são apresentadas em anexo (tabela A1 e figura A1).

Tabela 1 – Concentrações (mg/ml) dos padrões individuais adicionados para obter as soluções padrão 1 a 6, utilizadas para traçar as retas de calibração necessárias para os testes de recuperação.

Soluções Stock	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6
C ₁₈	2,3E-03	5,5E-03	7,8E-03	1,1E-02	1,6E-02	2,2E-02
C ₂₄	2,7E-03	5,4E-03	8,1E-03	1,1E-02	1,6E-02	2,2E-02
C ₃₀	2,5E-03	4,9E-03	7,4E-03	9,8E-03	1,5E-02	2,0E-02
PB	2,6E-03	5,2E-03	7,8E-03	1,0E-02	1,6E-02	2,1E-02
2-EN	2,5E-03	5,0E-03	7,4E-03	9,9E-03	1,5E-02	2,0E-02
Per	2,5E-03	5,0E-03	7,5E-03	1,0E-02	1,5E-02	2,0E-02
PI (Cycy)	2,6E-02	2,6E-02	2,6E-02	2,6E-02	2,6E-02	2,6E-02

2.2.2. Quantificação de MOH

Para quantificação de MOH nas amostras, foi preparada uma solução padrão stock (nas mesmas concentrações da solução Padrão 2) sem a adição de padrão interno. Desta solução foram preparadas várias diluições (25, 50, 100, 200, 400 e 1000 vezes) às quais se adicionaram 25 µl da solução stock de PI (tabela 2). O volume final (10 ml) foi completado com tolueno. Na tabela A2 dos anexos são apresentados os volumes da solução padrão stock utilizados para obter os padrões A a F. O padrão C₃₀ não foi detetado na solução padrão mais diluída, pelo que a reta de calibração do C₃₀ foi traçada com apenas 5 pontos (figura A2, em anexo).

Tabela 2 – Concentrações (mg/ml) dos padrões A a F, utilizados para traçar as retas de calibração necessárias para quantificar MOH nas amostras, em modo SIM.

Soluções Stock	Padrão A (25x)	Padrão B (50x)	Padrão C (100x)	Padrão D (200x)	Padrão E (400x)	Padrão F (1000x)
C ₁₈	2,1E-04	1,0E-04	5,2E-05	2,60E-05	1,3E-05	5,2E-06
C ₂₄	2,2E-04	1,1E-04	5,4E-05	2,70E-05	1,4E-05	5,4E-06
C ₃₀	2,0E-04	9,8E-05	4,9E-05	2,45E-05	1,2E-05	4,9E-06
PB	2,1E-04	1,0E-04	5,2E-05	2,60E-05	1,3E-05	5,2E-06
2-EN	2,0E-04	9,9E-05	5,0E-05	2,48E-05	1,2E-05	5,0E-06
Per	2,0E-04	1,0E-04	5,0E-05	2,50E-05	1,3E-05	5,0E-06
PI (Cycy)	2,6E-03	2,6E-03	2,6E-03	2,6E-03	2,6E-03	2,6E-03

2.2.3. Quantificação de oleato de glicidilo e de palmitato de glicidilo.

Uma vez que não foi possível adquirir padrões de OG e de PG, foi utilizado PM como padrão indireto na quantificação daqueles ésteres nas amostras de arroz. Da solução stock de PM foram preparadas diferentes soluções padrão para as concentrações finais de 0,0042 mg/ml, 0,0084 mg/ml, 0,0210 mg/ml, 0,0420 mg/ml e 0,0629 mg/ml. A todas as soluções foram adicionados 500 µl da solução stock de PI, para uma concentração final de 0,0520 mg/ml e os balões volumétricos foram preenchidos com tolueno até 10 ml. Os volumes adicionados para cada solução padrão, o gráfico da reta de calibração e um cromatograma da solução mais concentrada de PM são apresentados em anexo (tabela A3 e figuras A3 e A5).

2.3. Preparação das amostras

Das amostras de arroz agulha, arroz basmati e açúcar branco, foram pesadas 20 g e adicionados 20 ml de hexano. A extração decorreu *overnight* em agitação, à temperatura ambiente. De seguida, a mistura foi filtrada e o extrato resultante foi concentrado utilizando um evaporador rotativo a uma temperatura máxima de 45 °C. Após este passo, o extrato foi mantido em gelo. Ao extrato obtido foram adicionados 25 µl (quantificação de MOH) ou 500 µl (quantificação de OG e PG) da solução stock do PI e hexano, de modo a perfazer um volume final de 10 ml em balão volumétrico.

Para a realização dos testes de recuperação, às 20 g de cada amostra foram adicionados 100 µl de cada solução stock dos padrões individuais, exceto do padrão interno, previamente à extração *overnight*. Após filtração e evaporação do solvente, foram adicionados 250 µl da solução stock do PI antes de completar o volume com hexano até 10 ml. Também foram realizados ensaios controlo, com 20 ml de hexano, aos quais foram adicionados 100 µl de cada solução stock dos padrões individuais e deixados *overnight*, nas mesmas condições das amostras. O PI (250 µl) foi adicionado somente após o extrato ter sido levado ao evaporador rotativo e foi adicionado hexano até completar um volume final de 10 ml em balão volumétrico. As percentagens de recuperação foram calculadas pela razão entre as concentrações obtidas nos extratos das amostras e as concentrações esperadas após contaminação intencional com quantidades conhecidas de cada MOH.

2.4. Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa - Parâmetros da técnica

Usando um injetor automático AOC-20i, os padrões e os extratos das amostras foram injetados num equipamento de cromatografia gasosa acoplado a um detetor de espectrometria de massa, GCMS-QP2010 Ultra, da Shimadzu. Foi injetado 1 µl dos extratos e dos padrões usando uma coluna do tipo DB-1MS com 30 m de comprimento, 0,320 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

Programa do GC: iniciando a 60 °C (4 min), a temperatura do forno foi programada para um gradiente de 4 °C/min até 280 °C (6 min). O gás de arraste, hélio, foi regulado para uma velocidade linear de 40,0 cm/s. A temperatura do injetor foi 300 °C. O modo de injeção usado para os testes de recuperação foi *split* (1:10). Para quantificação de MOH, de OG e de PG o modo de injeção usado foi *splitless* (1 min *sampling time*).

Parâmetros do MS: os padrões 1 a 6, os padrões de PM e os extratos foram analisados em modo de varrimento para um intervalo de 50 a 510 m/z . Para quantificação de MOH, tanto os padrões A a F como os extratos foram analisados em modo SIM (*selected ion monitoring*), de forma a aumentar a sensibilidade de detecção. Nos extratos foram pesquisados e quantificados apenas os MOH utilizados como padrões. Na tabela 3 estão descritos os valores da razão massa/carga (m/z) utilizados para cada MOH e respectivo intervalo de tempo. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram 300 °C e 200 °C, respectivamente. O modo de ionização é de impacto eletrônico (70 eV).

Tabela 3 – Valores da razão massa/carga (m/z) e respectivo intervalo de tempo utilizados em modo SIM para determinar os MOH (utilizados como padrões) nos extratos de arroz e açúcar.

MOH	Início (min)	Fim (min)	m/z
PB	12,5	13,0	91; 148
PI (Cycy)	17,5	18,2	82; 166
2-EN	20,0	20,5	141; 156
C ₁₈	32,5	33,2	57; 225; 254
C ₂₄	46,2	46,7	57; 295; 338
Per	53,0	53,5	252
C ₃₀	56,8	57,4	57; 379; 422

3. Resultados

3.1. Desempenho do método de extração

Para validar o método de extração foram realizados testes de recuperação nas 3 amostras, usando o procedimento de adição descrito anteriormente. As concentrações de cada solução stock dos padrões individuais foram programadas com base nas quantidades de MOSH e MOAH presentes em amostras descritas na literatura. Ensaios só com hexano, também foram realizados para verificar as percentagens de recuperação dos padrões. Na tabela 4 estão presentes as médias das percentagens de recuperação para cada padrão, em cada amostra e no hexano, e também os pontos de ebulição de cada padrão.

Tabela 4 – Média das percentagens de recuperação obtidas para 3 réplicas de cada amostra e do ensaio controlo e respetivo desvio padrão. O ponto de ebulição (p.e.) de cada MOH é também apresentado.

	<i>Recuperação (%)</i>					
	C ₁₈	C ₂₄	C ₃₀	PB	2-EN	Per
Açúcar	98,4 ± 1,4	93,8 ± 1,4	88,6 ± 2,8	67,6 ± 3,1	82,9 ± 7,1	79,7 ± 12,2
Basmati	95,1 ± 5,7	102,8 ± 0,9	101,5 ± 4,1	81,5 ± 1,8	99,6 ± 1,7	109,5 ± 5,6
Agulha	96,2 ± 5,4	106,0 ± 1,2	104,4 ± 2,6	79,3 ± 6,8	95,0 ± 6,1	122,5 ± 10,6
Hexano	105,1 ± 1,7	108,3 ± 2,8	95,4 ± 6,0	64,9 ± 3,4	78,7 ± 6,3	106,3 ± 12,2
p.e. (°C)	317	391	449	205	257	> 500

As percentagens de recuperação dos padrões no açúcar variam entre 64,3 e 93,7% para MOAH e de 86,1 a 99,8% para MOSH. No arroz basmati a recuperação de MOAH encontra-se entre 79,7 e 116,0% e varia de 89,1 a 104,7% para MOSH. No arroz agulha obteve-se percentagens de recuperação desde 73,2 até 131,6% para MOAH e entre 91,4 e 107,1% para MOSH. As percentagens de recuperação no hexano variam entre 88,4 e 111,1% para MOAH e entre 61,0 e 117,1% para MOSH. O PB é o MOH que apresenta percentagens de recuperação mais baixas. A figura 4 mostra um cromatograma do extrato de açúcar e outro de hexano, podendo-se observar a sequência de eluição e os tempos de retenção dos padrões.

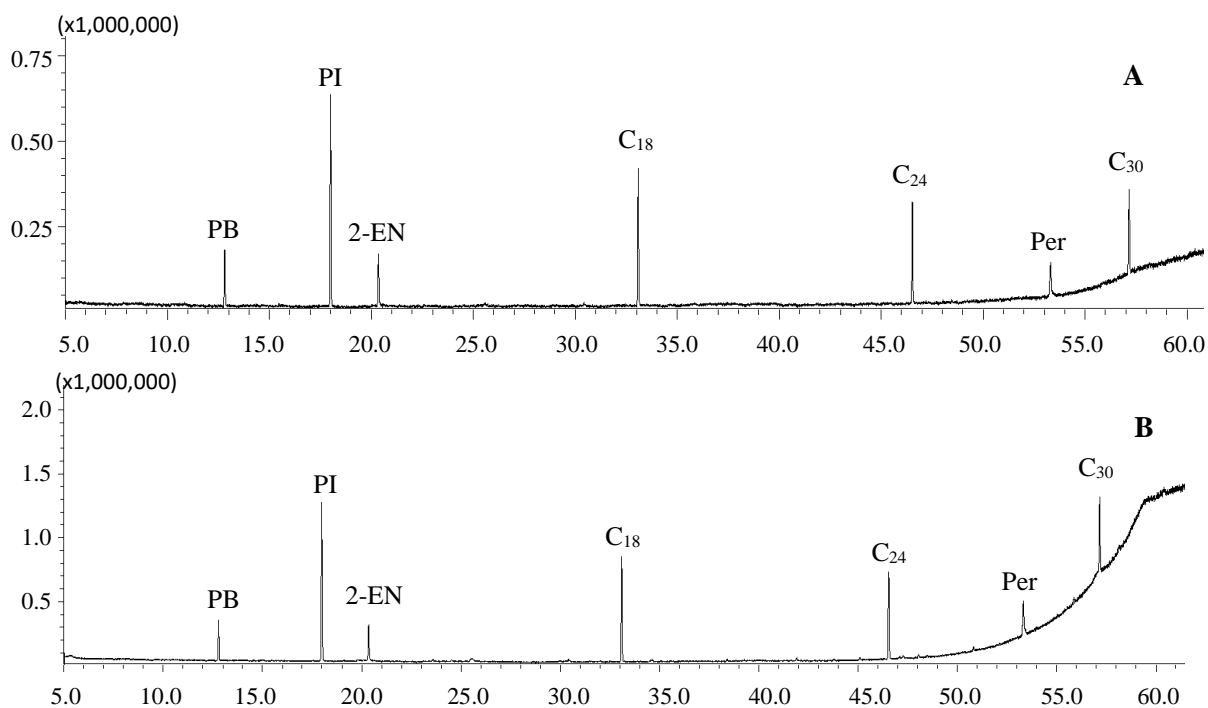


Figura 4 – Cromatogramas (*split*; varrimento) de açúcar (A) e hexano (B) com os vários padrões adicionados intencionalmente para determinação das percentagens de recuperação. Os resultados apresentados correspondem a uma experiência representativa de três réplicas.

3.2. Quantificação de MOH (em modo SIM)

Após a realização dos testes de recuperação procedeu-se à análise da presença de MOSH e MOAH nos extratos de arroz e de açúcar. Esta análise foi realizada em SIM, tendo selecionado apenas os valores de m/z dos hidrocarbonetos utilizados como padrões (tabela 3). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados para cada padrão, por meio da equação da linha de tendência obtida para cada padrão (figura 2A dos anexos). Na tabela 5 estão apresentados os valores determinados dos LD e LQ. Em todos os extratos analisados os MOH encontram-se abaixo do LD.

Tabela 5 – Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para os vários MOH (mg/kg), pesquisados nos extratos.

Padrões	LD	LQ
C₁₈	5,3E-02	1,8E-01
C₂₄	9,0E-02	3,0E-01
C₃₀	9,8E-02	3,3E-01
PB	8,4E-02	2,3E-01
2-EN	2,4E-02	7,9E-02
Per	3,6E-02	1,2E-01

3.3. Quantificação de oleato de glicidilo e de palmitato de glicidilo (em modo de varrimento)

Na figura 5 encontram-se os cromatogramas dos extratos de arroz agulha (A) e arroz basmati (B). No arroz agulha foi detetado um pico largo identificado pela livreria do equipamento como correspondente a ácido linoleico e ainda um pico de esqualeno. Em ambos se detetou β -sitosterol (61,0 – 61,5 min), cujos picos têm áreas semelhantes. Verificou-se ainda a presença de picos definidos correspondes ao PG, entre 43,5 e 44,0 min, e de OG, entre 47,0 e 47,3 min. Os espectros de MS correspondentes aos sinais que foram detetados nas amostras e que permitiram a identificação do PG e do OG estão presentes na figura A6 dos anexos. O sinal que se encontra imediatamente antes do sinal do OG foi identificado como correspondendo a um álcool de cadeia longa. Os limites de detecção e de quantificação determinados são de 1,79 e 5,96 mg/kg, respetivamente. O arroz basmati contém $13,7 \pm 0,5$ mg/kg de OG e o arroz agulha apresentou uma contaminação por OG de $11,2 \pm 0,3$ mg/kg. O PG encontra-se abaixo do limite de quantificação, embora acima do limite de detecção.

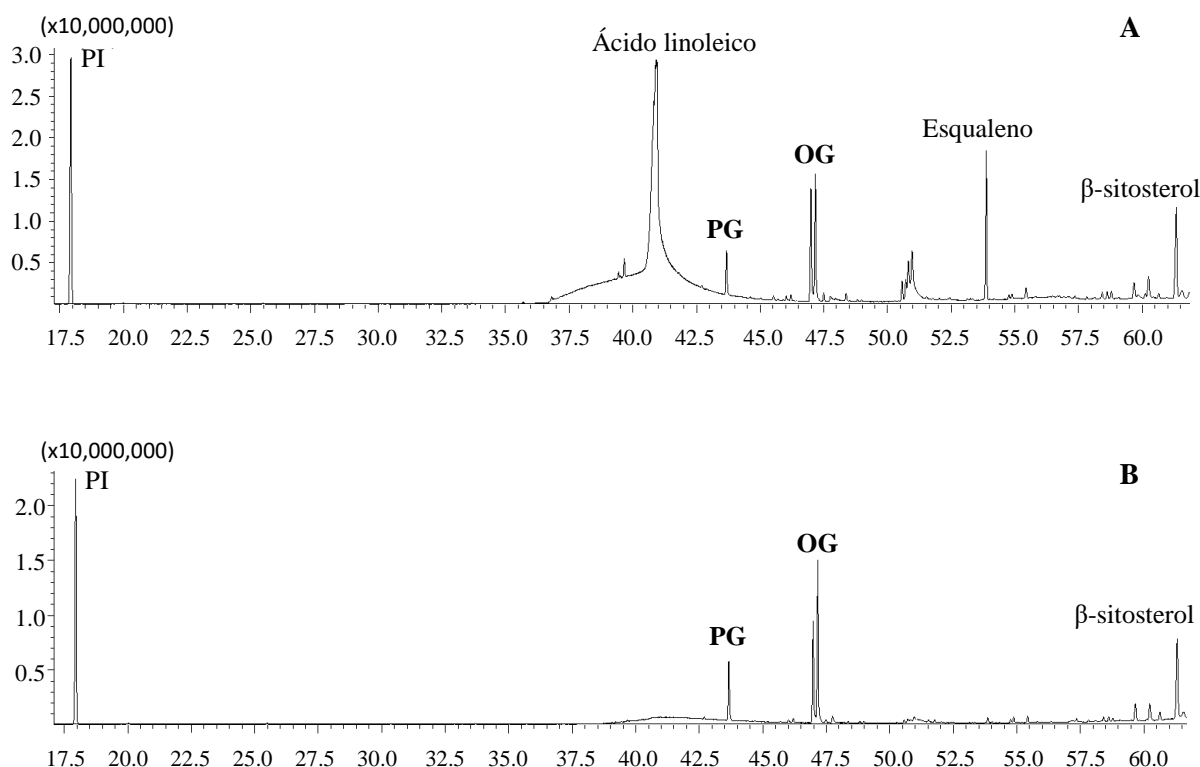


Figura 5 – Cromatogramas (*splitless*; varrimento) dos extratos de arroz agulha (A) e arroz basmati (B), onde é possível observar os picos correspondentes a PG e OG. Os dados estão apresentados a partir de cerca dos 17,5 min e correspondem a uma experiência representativa de três réplicas.

4. Discussão

Alimentos contaminados com produtos derivados do petróleo representam um perigo para a saúde dos consumidores, comprometendo a segurança alimentar. As embalagens de cartão reciclado são importantes fontes de contaminação e a migração de MOH para os produtos alimentares tem vindo a ser analisada.^{56,76} A utilização de papel ou cartão reciclado, embora seja benéfico para o ambiente, pode por em risco a saúde dos consumidores. Os MOAH são potencialmente mutagénicos e cancerígenos e os MOSH podem-se acumular nos órgãos, causando efeitos adversos. Embora este problema de migração de MOH das embalagens para os alimentos seja conhecido, assim como outras fontes de contaminação ao longo do processo de produção, não existe regulamentação suficiente que assegure a proteção dos consumidores. Alguns autores estimam que o nosso corpo tem cerca de 1 g de óleos minerais parafínicos, concluindo que os MOSH são o maior contaminante do corpo humano.^{63,87} Deve-se ter em consideração que os MOSH podem-se acumular ao longo da

vida, mas existem também outras fontes, além de produtos alimentares, que podem contribuir para este facto, tais como cremes, batons, ou mesmo por inalação.

O presente trabalho teve como objetivo inicial a realização de um estudo sobre a presença de MOSH e MOAH em amostras de arroz e de açúcar. Para esta análise foi utilizada a técnica de GC-MS. As percentagens de recuperação obtidas nos testes efetuados são elevadas, apresentando valores mais baixos para o pentilbenzeno, o que pode estar relacionado com o ponto de ebulição, o mais baixo relativamente aos restantes padrões. As percentagens de recuperação obtidas no ensaio controlo, realizado somente com hexano, são próximas das obtidas com as amostras, indicando que não existem outras perdas durante o processo de extração, por exemplo as relacionadas com fenómenos de adsorção à matriz.

Uma vez que as amostras extraídas inicialmente não apresentaram contaminação por MOSH e MOAH quando analisadas no modo de varrimento (figura A4 dos anexos), decidimos começar o estudo pela pesquisa dos padrões C₁₈, C₂₄ e C₃₀ de MOSH e PB, 2-EN e Per de MOAH em modo SIM. Das três amostras estudadas, o açúcar foi a que apresentou cromatogramas com menos sinais, não sendo detetado nenhum contaminante. Contudo, foi analisado açúcar em pó em estudos anteriores, nos quais se encontraram MOH. Mondello,⁸⁸ utilizando o método GC × GC-FID detetou concentrações de 8,4 e 1,3 mg/kg de MOSH e MOAH, respetivamente. Também num outro estudo realizado pela Foodwatch⁸⁹ se detetaram estes contaminantes em açúcar em pó. Foram quantificados 3,4 mg/kg de MOSH, sendo esta considerada uma contaminação média (2 – 5 mg/kg) e 0,5 mg/kg de MOAH. No cromatograma do arroz agulha (figura 5 A) foi detetado um sinal correspondente ao esqualeno, tipicamente detetado no arroz.⁷⁶ O esqualeno pode ser removido por epoxidação. Nesta amostra observa-se um sinal largo, entre os 40 e os 42 min, identificado como ácido linoleico, um ácido gordo essencial que se espera encontrar naturalmente no arroz. Tanto no arroz basmati como no arroz agulha foi detetada a presença de β -sitosterol (figura 5 A e B). Outros esteróis vegetais, nomeadamente o campesterol e o estigmasterol também foram encontrados, embora os picos tenham áreas inferiores (figura A4 dos anexos).

Em ambas as amostras de arroz, analisadas em modo SIM, os MOSH e os MOAH pesquisados encontram-se abaixo do limite de deteção (tabela 6). No entanto, vários estudos têm demonstrado que o arroz está contaminado com produtos de óleos minerais. No estudo realizado por Mondello⁸⁸ também foi analisado arroz, tendo-se obtido concentrações de 33,8 mg/kg para MOSH e de 2,2 mg/kg para MOAH. Biedermann *et al.*⁴⁹ utilizando o método de

HPLC-GC-FID avaliaram a presença destes contaminantes em duas amostras de arroz basmati. Numa delas foi totalizado 10 mg/kg de MOSH e 4,3 mg/kg de MOAH. A outra amostra apresentou menor contaminação, contendo 1,7 mg/kg de MOSH e 0,4 mg/kg de MOAH. No estudo efetuado pela Foodwatch⁸⁹ foram testadas sete marcas de arroz (adquiridos na França). Apenas em uma não foram detetados MOSH nem MOAH. Nas restantes as concentrações de MOSH variam entre 0,2 e 5 mg/kg. Em três amostras foram detetados MOAH, sendo 1,1 mg/kg a maior concentração encontrada. Neste estudo as embalagens também foram avaliadas, tendo-se constatado que o arroz com maior contaminação tinha a embalagem mais contaminada. O facto de, em SIM, não se terem detetado MOH, pode estar relacionado com o método de análise utilizado, visto que não possibilita uma análise da totalidade de MOSH e de MOAH que poderiam estar presentes nas amostras, mas somente a pesquisa dos valores m/z seleccionados nas janelas pré-definidas.

No decorrer da análise dos cromatogramas para a determinação de MOH em varrimento, verificou-se a presença de picos de elevadas áreas tanto no arroz basmati como no arroz agulha, identificados como oleato de glicidilo. Picos de palmitato de glicidilo foram também identificados nestas mesmas amostras (figura 5 A e B). Estas substâncias consistem em ésteres de glicidol e de ácidos gordos que são solúveis em solventes apolares e, por isso, foram extraídos com o hexano. Tendo em consideração que o glicidol é um composto potencialmente cancerígeno e devido à elevada intensidade dos sinais procedeu-se à quantificação destas substâncias. O PG encontra-se abaixo do limite de quantificação. Do OG foram detetados $13,7 \pm 0,5$ mg/kg no arroz basmati e $11,2 \pm 0,3$ mg/kg no arroz agulha (tabela 6). A única fonte identificada de ésteres de glicidilo nos alimentos são os óleos vegetais refinados. Em particular, estes compostos são encontrados em abundância em óleo de palma refinado, pois este óleo contém elevadas quantidades de diacilgliceróis. Em 2003, Blumhorst *et al.*⁹⁰ analisaram os ésteres de glicidilo presentes em óleos alimentares por LC-MS, tendo detetado quantidades entre 2,34 e 2,39 mg/kg de PG e entre 5,11 e 5,37 mg/kg de OG em óleo de palma. No total, o óleo de palma continha entre 9,26 e 9,40 mg/kg de ésteres de glicidilo. Steenbergen *et al.*⁹¹ utilizaram o método de GC-MS para a análise de ésteres de glicidilo em óleos alimentares. Em óleo de palma refinado observaram uma concentração total de ésteres de glicidilo de 30,2 mg/kg. De OG e PG foram detetados 12,7 mg/kg e 9,82 mg/kg, respetivamente. Neste estudo também foi detetada uma concentração de 1,56 mg/kg

de ésteres de glicidilo em óleo de soja refinado. Verifica-se que a concentração de ésteres de glicidilo no óleo de palma é muito superior à detetada no óleo de soja. As concentrações de OG e PG encontradas são superiores às detetadas no estudo anterior,⁹⁰ no qual o óleo de palma não era refinado. Ainda num outro estudo, Shiro *et al.*⁹² detetaram concentrações de ésteres de glicidilo entre 25,6 e 28,0 mg/kg em óleo de palma refinado. Estes valores estão próximos dos encontrados por Steenbergen *et al.*⁹¹. Shiro *et al.*⁹² analisaram também óleo de arroz refinado, para o qual obtiveram concentrações próximas (27.22 a 28.76 mg/kg) ao óleo de palma refinado. Baseado nisto, pode-se supor que o facto de o arroz analisado neste trabalho conter OG e PG indica uma contaminação por óleos vegetais refinados. Os óleos vegetais podem ser utilizados pelas indústrias como óleos lubrificantes. Fatores que podem levar à utilização de óleos lubrificantes à base de óleos vegetais relacionam-se com a qualidade dos óleos vegetais (os óleos minerais também necessitam de aditivos), o desempenho satisfatório em várias aplicações, nomeadamente óleos hidráulicos, preço, segurança e também o facto de serem biodegradáveis.⁹³ Uma vez que os óleos vegetais são processados de modo a melhorar as suas propriedades como óleos lubrificantes e esses óleos podem ser utilizados pelas indústrias do setor alimentar, ou mesmo em máquinas agrícolas, os alimentos podem ser contaminados com os seus constituintes, nomeadamente com os ésteres de glicidilo. Além disso, a presença de ésteres de glicidilo em lubrificantes tem sido documentada.⁹⁴ Contudo, é necessário uma análise detalhada para determinar a origem desta contaminação, assim como a análise de outros alimentos que possam ter contacto com fontes de contaminação de ésteres de glicidilo.

Tabela 6 – Resultados obtidos nos ensaios de quantificação de MOH, OG e PG nas amostras de açúcar, arroz agulha e arroz basmati.

	Açúcar	Arroz basmati	Arroz agulha
MOH	< LD	< LD	< LD
OG	ND ^a	13,7 ± 0,5	11,2 ± 0,3
PG	ND ^a	< LQ	< LQ

^a ND – Não detetado.

5. Conclusões

No trabalho laboratorial realizado no Departamento de Química da Universidade de Aveiro foram analisadas amostras de açúcar e de arroz, recorrendo à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) para avaliar a contaminação por hidrocarbonetos de óleos minerais (MOH) e outros contaminantes voláteis detetáveis por GC, após extração das amostras com hexano à temperatura ambiente. As percentagens de recuperação obtidas nos testes efetuados são elevadas, embora apresentando valores mais baixos para o pentilbenzeno, o mais volátil de todos os compostos analisados. As percentagens de recuperação obtidas no ensaio realizado só com hexano e sem amostra, são próximas das obtidas nos ensaios reais, indicando que não existem outras perdas durante o processo de extração, nomeadamente as relacionadas com fenómenos de adsorção à matriz.

De acordo com os resultados obtidos, tanto nas duas amostras de arroz como no açúcar os hidrocarbonetos de óleos minerais pesquisados estavam abaixo do limite de deteção. No entanto, existem evidências na literatura que demonstram uma forte contaminação de alguns produtos alimentares análogos por MOH, embora esses estudos tenham sido feitos em outros países e com amostras diferentes.

Também foi possível quantificar a contaminação das amostras de arroz agulha e basmati por ésteres de glicidilo (oleato de glicidilo e palmitato de glicidilo), que não foram observados nos cromatogramas dos extratos do açúcar. O palmitato de glicidilo mostrou estar abaixo do limite de quantificação mas foi detetada contaminação por oleato de glicidilo nas duas amostras de arroz. Os ésteres de glicidilo são normalmente associados a contaminantes de óleos vegetais refinados. Assim sendo, a contaminação no arroz agulha e no basmati pode resultar da utilização de óleos lubrificantes de origem vegetal em equipamentos industriais, tanto no campo como no processamento posterior.

Em trabalhos futuros seria interessante tentar otimizar, ou mesmo mudar, o método de extração, visto que foram verificadas algumas diferenças no perfil de cromatogramas da mesma amostra, mas de extratos distintos. Aspectos como temperatura, tempo e agitação deveriam ser analisados mais em detalhe e sistematizados. Além disso, o desenvolvimento de outras técnicas de extração que permitam remover eventuais interferências, nomeadamente de gorduras, e que podem prejudicar a análise de contaminantes residuais, é extremamente importante e um dos assuntos atuais de investigação nesta área. Seria também importante avaliar a contaminação de outros produtos alimentares por ésteres de glicidilo,

reconhecidamente cancerígenos, assim como a realização de estudos para identificação da origem da contaminação, inclusive em matrizes mais complexas.

Capítulo III – Referências

- (1) Manley, D. 1 - Setting the Scene: A History and the Position of Biscuits. In *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies (Fourth edition)*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2011; pp 1–9.
- (2) Delcour, J. A.; Hoseney, R. C. *Principles of Cereal Science and Technology*; Textbooks; AACC International, Inc., 2010.
- (3) Cereals and Cereal Products. <http://www.fao.org/es/faodef/fdef01e.htm> (accessed Oct 11, 2016).
- (4) Wrigley, C. W. Wheat: A Unique Grain for the World. In *Romania*; 2009; Vol. 7, pp 2–9.
- (5) Manley, D.; Pareyt, B.; Delcour, J. A. 9 - Wheat Flour and Vital Wheat Gluten as Biscuit Ingredients. In *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies (Fourth edition)*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2011; pp 109–133.
- (6) Hoseney, R. C.; Rogers, D. E. The Formation and Properties of Wheat Flour Doughs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1990, 29 (2), 73–93.
- (7) Ao, Z.; Jane, J. Characterization and Modeling of the A- and B-Granule Starches of Wheat, Triticale, and Barley. *Carbohydr. Polym.* 2007, 67 (1), 46–55.
- (8) Zhang, Y.; Guo, Q.; Feng, N.; Wang, J.; Wang, S.; He, Z. Characterization of A- and B-Type Starch Granules in Chinese Wheat Cultivars. *J. Integr. Agric.* 2016, 15 (10), 2203–2214.
- (9) Liu, P.; Guo, W.; Jiang, Z.; Pu, H.; Feng, C.; Zhu, X.; Peng, Y.; Kuang, A.; Little, C. R. Effects of High Temperature after Anthesis on Starch Granules in Grains of Wheat (*Triticum Aestivum* L.). *J. Agric. Sci.* 2011, 149 (2), 159–169.
- (10) Zhang, T.; Wang, Z.; Yin, Y.; Cai, R.; Yan, S.; Li, W. Starch Content and Granule Size Distribution in Grains of Wheat in Relation to Post-Anthesis Water Deficits. *J. Agron. Crop Sci.* 2010, 196 (1), 1–8.
- (11) Maningat, C. C.; Seib, P. A.; Bassi, S. D.; Woo, K. S.; Lasater, G. D. Chapter 10 - Wheat Starch: Production, Properties, Modification and Uses. In *Starch (Third Edition)*; Food Science and Technology; Academic Press: San Diego, 2009; pp 441–510.
- (12) Takeo, K.; Tokumura, A.; Kuge, T. Complexes of Starch and its Related Materials with Organic Compounds. Part. X. X-Ray Diffraction of Amylose-Fatty Acid Complexes. *Starch - Stärke* 1973, 25 (11), 357–362.
- (13) Yamashita, Y.; Monobe, K. Single Crystals of Amylose V Complexes. III. Crystals with 81 Helical Configuration. *J. Polym. Sci. Part -2 Polym. Phys.* 1971, 9 (8), 1471–1481.
- (14) Goesaert, H.; Brijs, K.; Veraverbeke, W. S.; Courtin, C. M.; Gebruers, K.; Delcour, J. A. Wheat Flour Constituents: How They Impact Bread Quality, and How to Impact Their Functionality. *Trends Food Sci. Technol.* 2005, 16 (1–3), 12–30.
- (15) Tester, R. F.; Debon, S. J. Annealing of Starch—a Review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2000, 27 (1), 1–12.
- (16) Miles, M. J.; Morris, V. J.; Orford, P. D.; Ring, S. G. The Roles of Amylose and Amylopectin in the Gelation and Retrogradation of Starch. *Carbohydr. Res.* 1985, 135 (2), 271–281.
- (17) Osborne, T. *The Vegetable Proteins*; Longmans, Green And Co ;London, 1924.
- (18) Veraverbeke, W. S.; Delcour, J. A. Wheat Protein Composition and Properties of Wheat Glutenin in Relation to Breadmaking Functionality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2002, 42 (3), 179–208.
- (19) Shewry, P. R.; Halford, N. G. Cereal Seed Storage Proteins: Structures, Properties and Role

- in Grain Utilization. *J. Exp. Bot.* 2002, 53 (370), 947–958.
- (20) Amend, T.; Belitz, H.-D. Microstructural Studies of Gluten and a Hypothesis on Dough Formation. *Food Struct.* 1991, 10 (4), 1.
 - (21) Singh, H.; MacRitchie, F. Application of Polymer Science to Properties of Gluten. *J. Cereal Sci.* 2001, 33 (3), 231–243.
 - (22) Gan, Z.; Ellis, P. R.; Schofield, J. D. Gas Cell Stabilisation and Gas Retention in Wheat Bread Dough. *J. Cereal Sci.* 1995, 21 (3), 215–230.
 - (23) Uthayakumaran, S.; Newberry, M.; Keentok, M.; Stoddard, F. L.; Bekes, F. Basic Rheology of Bread Dough with Modified Protein Content and Glutenin-to-Gliadin Ratios. *Cereal Chem.* 2000, 77 (6), 744–749.
 - (24) Khatkar, B. S.; Bell, A. E.; Schofield, J. D. The Dynamic Rheological Properties of Glutens and Gluten Sub-Fractions from Wheats of Good and Poor Bread Making Quality. *J. Cereal Sci.* 1995, 22 (1), 29–44.
 - (25) Maache-Rezzoug, Z.; Bouvier, J.-M.; Allaf, K.; Patras, C. Effect of Principal Ingredients on Rheological Behaviour of Biscuit Dough and on Quality of Biscuits. *J. Food Eng.* 1998, 35 (1), 23–42.
 - (26) Atkinson, G. 12 - Fats and Oils as Biscuit Ingredients A2 - Manley, Duncan. In *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies (Fourth edition)*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2011; pp 160–180.
 - (27) Manley, D. 11 - Sugars and Syrups as Biscuit Ingredients. In *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies (Fourth edition)*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2011; pp 143–159.
 - (28) Manohar, R. S.; Rao, P. H. Effect of Sugars on the Rheological Characteristics of Biscuit Dough and Quality of Biscuits. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 75 (3), 383–390.
 - (29) Olewnik, M. C.; Kulp, K. The Effect of Mixing Time and Ingredient Variation on Farinograms of Cookie Doughs. *Cereal Chemistry*. 1984, pp 532–537.
 - (30) World Health Organization. *Guideline: Sugars Intake for Adults and Children*; Geneva, 2015.
 - (31) Savitha, Y. S.; Indrani, D.; Prakash, J. Effect of Replacement of Sugar with Sucralose and Maltodextrin on Rheological Characteristics of Wheat Flour Dough and Quality of Soft Dough Biscuits. *J. Texture Stud.* 2008, 39 (6), 605–616.
 - (32) Kweon, M.; Slade, L.; Levine, H. Potential Sugar Reduction in Cookies Formulated with Sucrose Alternatives. *Cereal Chem. J.* 2016, 93 (6), 576–583.
 - (33) WHO. Food safety. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/> (accessed Oct 18, 2016).
 - (34) FAO. 3. Important Food Issues. <http://www.fao.org/docrep/006/y8705e/y8705e03.htm> (accessed Oct 18, 2016).
 - (35) IFS Food. Standard for auditing quality and food safety of food products - version 6. <https://www.ifs-certification.com/index.php/en/download-standards?item=251>.
 - (36) ASAE. HACCP. <http://www.asae.pt/pagina.aspx?back=1&codigono=54105579AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA> (accessed Oct 19, 2016).
 - (37) *Codex Alimentarius: Food Hygiene*, 4. ed.; Codex Alimentarius Commission, Joint FAO WHO Food Standards Programme, Eds.; FAO: Rome, 2009.
 - (38) ASAE. Riscos Biológicos. <http://www.asae.pt/> (accessed Oct 19, 2016).

- (39) FDA. Food Code 2013.
<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/ucm374275.htm> (accessed Oct 19, 2016).
- (40) Afonso, A. Análise de Perigos. *Segur. E Qual. Aliment.* 2008, 5, 26–28.
- (41) Manley, D. 4 - Quality Control and Good Manufacturing Practice (GMP) in the Biscuit Industry. In *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies (Fourth edition)*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2011; pp 29–40.
- (42) Drake, M. A. Sensory Analysis of Dairy Foods. *J. Dairy Sci.* 2007, 90 (11), 4925–4937.
- (43) Manley, D.; Clark, H. 42 - Biscuit Packaging and Storage. In *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies (Fourth edition)*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2011; pp 547–563.
- (44) Regulamento (UE) No 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/pt/ALL/?uri=CELEX%3A32011R1169> (accessed Apr 28, 2017).
- (45) Mandala, I. G.; Ioannou, C. A.; Kostaropoulos, A. E. Textural Attributes of Commercial Biscuits. Effect of Relative Humidity on Their Quality. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006, 41 (7), 782–789.
- (46) Purcaro, G.; Barp, L.; Moret, S. Determination of Hydrocarbon Contamination in Foods. A Review. *Anal Methods* 2016, 8 (29), 5755–5772.
- (47) Levorsen, A. I.; Berry, F. A. F. *Geology of Petroleum*; AAPG Foundation: Tulsa, Okla, 2001.
- (48) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food: Mineral Oil Hydrocarbons in Food. *EFSA J.* 2012, 10 (6), 2704.
- (49) Biedermann, M.; Fiselier, K.; Grob, K. Aromatic Hydrocarbons of Mineral Oil Origin in Foods: Method for Determining the Total Concentration and First Results. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57 (19), 8711–8721.
- (50) Matissek, R.; Raters, M.; Dingel, A.; Schnapka, J. MOSH/MOAH food contamination. Focus on mineral oil residues. <http://www.int.laborundmore.com/archive/865542/MOSH-MOAH-food-contamination.html> (accessed Dec 13, 2016).
- (51) Neukom, H.-P.; Grob, K.; Biedermann, M.; Noti, A. Food Contamination by C20–C50 Mineral Paraffins from the Atmosphere. *Atmos. Environ.* 2002, 36 (30), 4839–4847.
- (52) Grundböck, F.; Fiselier, K.; Schmid, F.; Grob, K. Mineral Oil in Sunflower Seeds: The Sources. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231 (2), 209–213.
- (53) Grob, K.; Artho, A.; Biedermann, M.; Egli, J. Food Contamination by Hydrocarbons from Lubricating Oils and Release Agents: Determination by Coupled LC-GC. *Food Addit. Contam.* 1991, 8 (4), 437–446.
- (54) Moret, S.; Sander, M.; Purcaro, G.; Scolaro, M.; Barp, L.; Conte, L. S. Optimization of Pressurized Liquid Extraction (PLE) for Rapid Determination of Mineral Oil Saturated (MOSH) and Aromatic Hydrocarbons (MOAH) in Cardboard and Paper Intended for Food Contact. *Talanta* 2013, 115, 246–252.

- (55) Biedermann, M.; Grob, K. On-Line Coupled High Performance Liquid Chromatography–gas Chromatography for the Analysis of Contamination by Mineral Oil. Part 2: Migration from Paperboard into Dry Foods: Interpretation of Chromatograms. *J. Chromatogr. A* 2012, 1255, 76–99.
- (56) Vollmer, A.; Biedermann, M.; Grundböck, F.; Ingenhoff, J.-E.; Biedermann-Brem, S.; Altkofer, W.; Grob, K. Migration of Mineral Oil from Printed Paperboard into Dry Foods: Survey of the German Market. *Eur. Food Res. Technol.* 2011, 232 (1), 175–182.
- (57) Lommatzsch, M.; Richter, L.; Biedermann-Brem, S.; Biedermann, M.; Grob, K.; Simat, T. J. Functional Barriers or Adsorbent to Reduce the Migration of Mineral Oil Hydrocarbons from Recycled Cardboard into Dry Food. *Eur. Food Res. Technol.* 2016, 242 (10), 1727–1733.
- (58) International Agency for Research on Cancer (IARC). Mineral Oils (IARC Summary & Evaluation, Supplement7). <http://www.inchem.org/documents/iarc/suppl7/mineraloils.html> (accessed Jan 18, 2017).
- (59) Scotter, M. J.; Castle, L.; Massey, R. C.; Brantom, P. G.; Cunninghame, M. E. A Study of the Toxicity of Five Mineral Hydrocarbon Waxes and Oils in the F344 Rat, with Histological Examination and Tissue-Specific Chemical Characterisation of Accumulated Hydrocarbon Material. *Food Chem. Toxicol.* 2003, 41 (4), 489–521.
- (60) Smith, J. H.; Mallett, A. K.; Priston, R. A.; Brantom, P. G.; Worrell, N. R.; Sexsmith, C.; Simpson, B. J. Ninety-Day Feeding Study in Fischer-344 Rats of Highly Refined Petroleum-Derived Food-Grade White Oils and Waxes. *Toxicol. Pathol.* 1996, 24 (2), 214–230.
- (61) Baldwin, M. K.; Berry, P. H.; Esdaile, D. J.; Linnett, S. L.; Martin, J. G.; Peristianis, G. C.; Priston, R. A.; Simpson, B. J.; Smith, J. D. Feeding Studies in Rats with Mineral Hydrocarbon Food Grade White Oils. *Toxicol. Pathol.* 1992, 20 (3–1), 426–435.
- (62) Salvayre, R.; Nègre, A.; Rocchiccioli, F.; Duboucher, C.; Maret, A.; Vieu, C.; Lageron, A.; Polonovski, J.; Douste-Blazy, L. A New Human Pathology with Visceral Accumulation of Long-Chain N-Alkanes; Tissue Distribution of the Stored Compounds and Pathophysiological Hypotheses. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Lipids Lipid Metab.* 1988, 958 (3), 477–483.
- (63) Barp, L.; Kornauth, C.; Wuerger, T.; Rudas, M.; Biedermann, M.; Reiner, A.; Concini, N.; Grob, K. Mineral Oil in Human Tissues, Part I: Concentrations and Molecular Mass Distributions. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 72, 312–321.
- (64) Shoda, T.; Toyoda, K.; Uneyama, C.; Takada, K.; Takahashi, M. Lack of Carcinogenicity of Mediumviscosity Liquid Paraffin given in the Diet to F344 Rats. *Food Chem. Toxicol.* 1997, 35 (12), 1181–1190.
- (65) Horton, A. W.; Bolewicz, L. C.; Barstad, A. W.; Butts, C. K. Comparison of the Promoting Activity of Pristane and N-Alkanes in Skin Carcinogenesis with Their Physical Effects on Micellar Models of Biological Membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1981, 648 (1), 107–112.
- (66) LaVoie, E. J.; Coleman, D. T.; Rice, J. E.; Geddie, N. G.; Hoffmann, D. Tumor-Initiating Activity, Mutagenicity, and Metabolism of Methylated Anthracenes. *Carcinogenesis* 1985, 6 (10), 1483–1488.
- (67) Scientific Committee for Food; European Commission. *Report of the Scientific Committee for Food on Adverse Reactions to Food and Food Ingredients. Opinion of the Scientific Committee for Food on Mineral and Synthetic Hydrocarbons.*; European Commission, Directorate-General for Industry: Luxembourg, 1997.

- (68) WHO. *Evaluation of Certain Food Additives (Fifty-Ninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)*; 2002.
- (69) EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. Scientific Opinion on the Use of High Viscosity White Mineral Oils as a Food Additive: The Use of High Viscosity White Mineral Oils as a Food Additive. *EFSA J.* 2009, 7 (11), 1387.
- (70) BfR. 7. Sitzung der BfR-Kommission für Bedarfsgegenstände. <http://www.bfr.bund.de/de/suche.html?search%5Bquery%5D=Protokoll+der+Sitzung+vom+14.+April+2011+&page=1> (accessed Jan 10, 2017).
- (71) Regulamento (CE) No 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro de 2004, relativo aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Directivas 80/590/CEE e 89/109/CEE. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32004R1935> (accessed Jan 18, 2017).
- (72) Regulamento (UE) No 10/2011 da Comissão de 14 de Janeiro de 2011 relativo aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32011R0010> (accessed Jan 18, 2017).
- (73) Biedermann, M.; Grob, K. On-Line Coupled High Performance Liquid Chromatography–gas Chromatography for the Analysis of Contamination by Mineral Oil. Part 1: Method of Analysis. *J. Chromatogr. A* 2012, 1255, 56–75.
- (74) Moret, S.; Scolaro, M.; Barp, L.; Purcaro, G.; Sander, M.; Conte, L. S. Optimisation of Pressurised Liquid Extraction (PLE) for Rapid and Efficient Extraction of Superficial and Total Mineral Oil Contamination from Dry Foods. *Food Chem.* 2014, 157, 470–475.
- (75) Grob, K.; Lanfranchi, M.; Egli, J.; Artho, A. Determination of Food Contamination by Mineral Oil from Jute Sacks Using Coupled LC-GC. *J. - Assoc. Off. Anal. Chem.* 1991, 74 (3), 506–512.
- (76) Biedermann, M.; Grob, K. Is Recycled Newspaper Suitable for Food Contact Materials? Technical Grade Mineral Oils from Printing Inks. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 230 (5), 785–796.
- (77) Moret, S.; Scolaro, M.; Barp, L.; Purcaro, G.; Conte, L. S. Microwave Assisted Saponification (MAS) Followed by on-Line Liquid Chromatography (LC)–gas Chromatography (GC) for High-Throughput and High-Sensitivity Determination of Mineral Oil in Different Cereal-Based Foodstuffs. *Food Chem.* 2016, 196, 50–57.
- (78) Lommatzsch, M.; Biedermann, M.; Simat, T. J.; Grob, K. Argentation High Performance Liquid Chromatography on-Line Coupled to Gas Chromatography for the Analysis of Monounsaturated Polyolefin Oligomers in Packaging Materials and Foods. *J. Chromatogr. A* 2015, 1402, 94–101.
- (79) Zoccali, M.; Barp, L.; Beccaria, M.; Sciarrone, D.; Purcaro, G.; Mondello, L. Improvement of Mineral Oil Saturated and Aromatic Hydrocarbons Determination in Edible Oil by Liquid-Liquid-Gas Chromatography with Dual Detection: Other Techniques. *J. Sep. Sci.* 2016, 39 (3), 623–631.
- (80) Biedermann, M.; Grob, K. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Characterizing Mineral Oils in Foods and Distinguishing Them from Synthetic Hydrocarbons. *J. Chromatogr. A* 2015, 1375, 146–153.
- (81) Biedermann, M.; Grob, K. Comprehensive Two-Dimensional GC after HPLC Preseparation for the Characterization of Aromatic Hydrocarbons of Mineral Oil Origin in Contaminated Sunflower Oil. *J. Sep. Sci.* 2009, 32 (21), 3726–3737.

- (82) Fiselier, K.; Fiorini, D.; Grob, K. Activated Aluminum Oxide Selectively Retaining Long Chain N-Alkanes: Part II. Integration into an on-Line High Performance Liquid Chromatography–liquid Chromatography–gas Chromatography–flame Ionization Detection Method to Remove Plant Paraffins for the Determination of Mineral Paraffins in Foods and Environmental Samples. *Anal. Chim. Acta* 2009, *634* (1), 102–109.
- (83) Fiselier, K.; Grob, K. Determination of Mineral Oil Paraffins in Foods by on-Line HPLC–GC–FID: Lowered Detection Limit; Contamination of Sunflower Seeds and Oils. *Eur. Food Res. Technol.* 2009, *229* (4), 679–688.
- (84) Destailats, F.; Craft, B. D.; Dubois, M.; Nagy, K. Glycidyl Esters in Refined Palm (*Elaeis Guineensis*) Oil and Related Fractions. Part I: Formation Mechanism. *Food Chem.* 2012, *131* (4), 1391–1398.
- (85) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks for Human Health Related to the Presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and Their Fatty Acid Esters, and Glycidyl Fatty Acid Esters in Food. *EFSA J.* 2016, *14* (5).
- (86) International Agency for Research on Cancer
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/index.php> (accessed Jul 6, 2017).
- (87) Concin, N.; Hofstetter, G.; Plattner, B.; Tomovski, C.; Fiselier, K.; Gerritzen, K.; Fessler, S.; Windbichler, G.; Zeimet, A.; Ulmer, H.; et al. Mineral Oil Paraffins in Human Body Fat and Milk. *Food Chem. Toxicol.* 2008, *46* (2), 544–552.
- (88) Mondello, L. Analysis of MOSH and MOAH using SPE prior to GCxGC-MS analysis | SHIMADZU (Shimadzu Corporation)
<http://www.shimadzu.com/an/literature/gcms/jpo213101.html> (accessed Jun 9, 2017).
- (89) Comment les huiles minérales contaminent riz, pâtes, etc. - foodwatch
<http://www.foodwatch.org/fr/s-informer/topics/emballages-toxiques/l-info-en-2-minutes/> (accessed Jul 9, 2017).
- (90) Blumhorst, M. R.; Collison, M. W.; Cantrill, R.; Shiro, H.; Masukawa, Y.; Kawai, S.; Yasunaga, K. Collaborative Study for the Analysis of Glycidyl Fatty Acid Esters in Edible Oils Using LC–MS. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2013, *90* (4), 493–500.
- (91) Steenbergen, H.; Hrnčířík, K.; Ermacora, A.; de Koning, S.; Janssen, H.-G. Direct Analysis of Intact Glycidyl Fatty Acid Esters in Edible Oils Using Gas Chromatography–mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2013, *1313*, 202–211.
- (92) Shiro, H.; Kondo, N.; Kibune, N.; Masukawa, Y. Direct Method for Quantification of Glycidol Fatty Acid Esters in Edible Oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, *113* (3), 356–360.
- (93) Erhan, S. Z.; Sharma, B. K.; Liu, Z.; Adhvaryu, A. Lubricant Base Stock Potential of Chemically Modified Vegetable Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2008, *56* (19), 8919–8925.
- (94) Ishida, N.; Hasegawa, H.; Sasaki, U.; Ishikawa, T. Synthetic Lubricating Oils. Pat. 5262076.

Anexos

1. Gráficos dos padrões

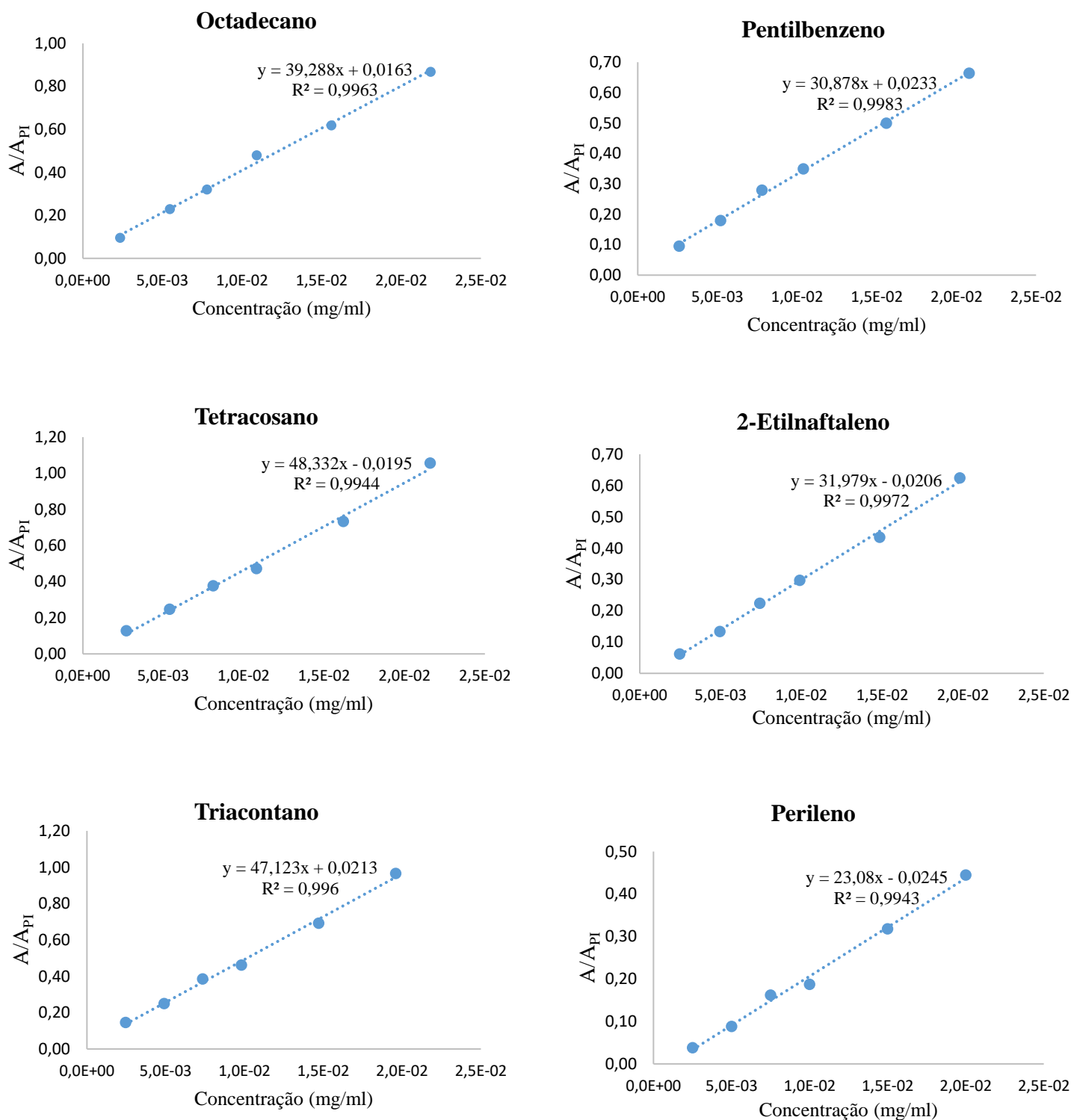


Figura A1 – Gráficos da razão entre a área do sinal do padrão (A) e a área do sinal do PI (A_{PI}) em função da concentração (mg/ml) do padrão. As equações das retas permitem determinar a concentração de cada padrão adicionado intencionalmente nas amostras, para obter as percentagens de recuperação. Em cada gráfico está identificado o padrão correspondente.

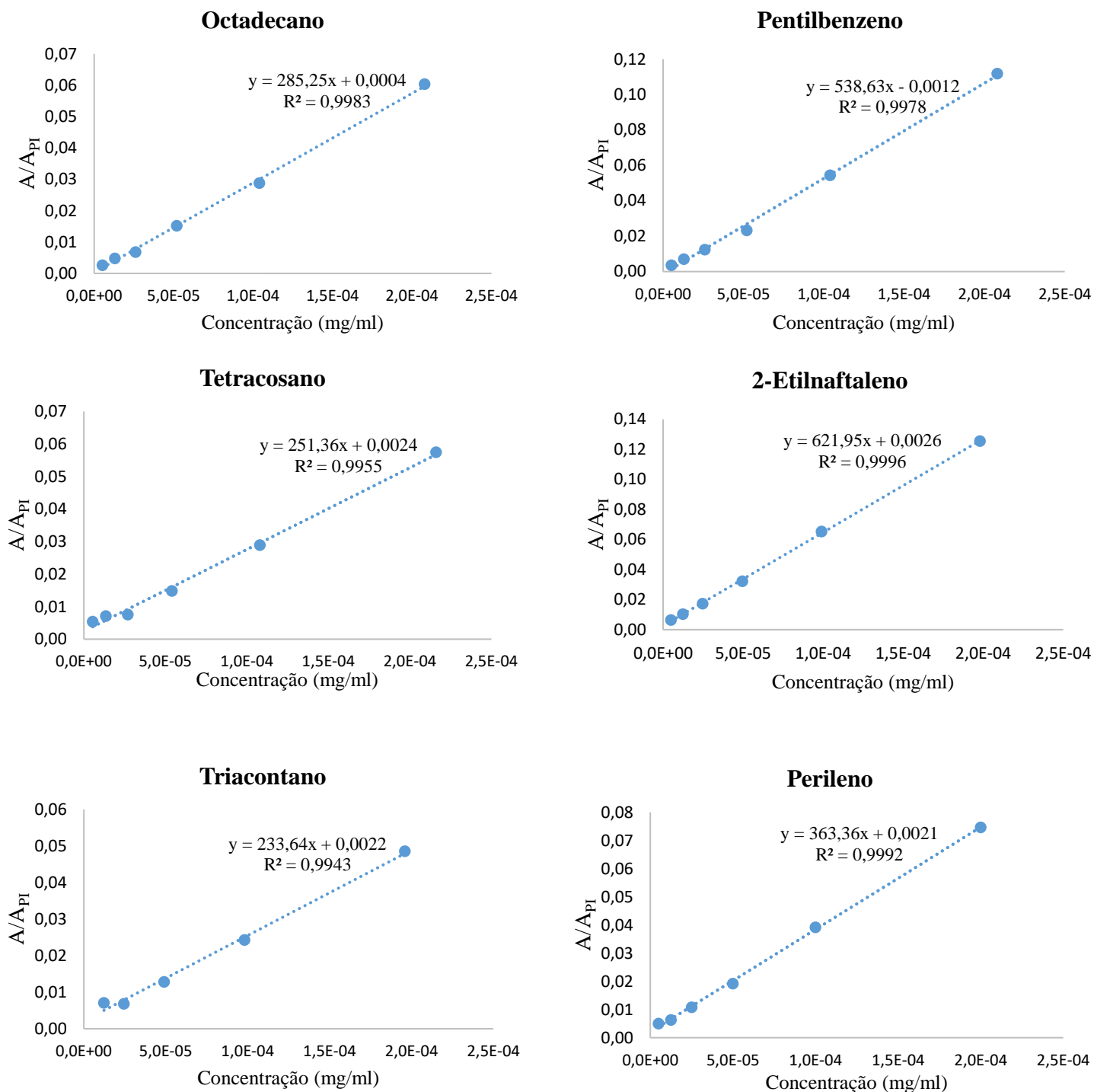


Figura A2 – Gráficos da razão entre a área do sinal do padrão (A) e a área do sinal do PI (A_{PI}) em função da concentração (mg/ml) do padrão. As equações das retas permitem determinar a concentração de cada um dos MOH presente nas amostras. Em cada gráfico está identificado o padrão correspondente.

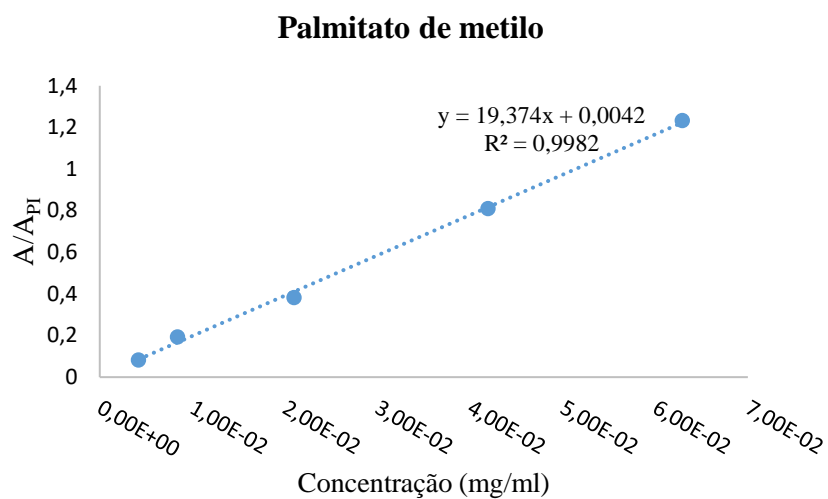


Figura A3 – Gráfico da razão entre a área do sinal do PM (A) e a área do sinal do PI (A_{PI}) em função da concentração (mg/ml) do PM. A equação da reta permite determinar as concentrações de OG e de PG presentes nas amostras de arroz.

2. Tabelas dos volumes utilizados nas soluções padrão

Tabela A1 – Volumes (μl) das soluções padrão individuais adicionados para obter as soluções padrão 1 a 6, utilizadas para traçar as retas de calibração necessárias para os testes de recuperação em modo de varrimento.

Soluções Stock	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Padrão 6
C₁₈	15	35	50	70	100	140
C₂₄	25	50	75	100	150	200
C₃₀	25	50	75	100	150	200
PB	25	50	75	100	150	200
2-EN	25	50	75	100	150	200
Per	25	50	75	100	150	200
PI (Cycy)	250	250	250	250	250	250

Tabela A2 – Volumes (μl) da solução padrão stock (semelhante ao Padrão 2) e da solução stock de PI adicionados para obter as soluções padrão A a F, utilizadas para traçar as retas de calibração necessárias para quantificar MOH em modo SIM.

Soluções stock	Padrão A (25x)	Padrão B (50x)	Padrão C (100x)	Padrão D (200x)	Padrão E (400x)	Padrão F (1000x)
Solução padrão stock	400	200	100	50	25	10
PI (Cycy)	25	25	25	25	25	25

Tabela A3 – Volumes (μl) da solução stock de PM e da solução stock de PI adicionados para obter as soluções padrão PM 1 a PM 5, utilizadas para traçar a reta de calibração necessária para quantificar OG e PG em modo de varrimento.

Soluções stock	PM 1	PM 2	PM 3	PM 4	PM 5
Solução PM	5	10	25	50	75
PI (Cycy)	500	500	500	500	500

3. Cromatogramas e espectros de MS

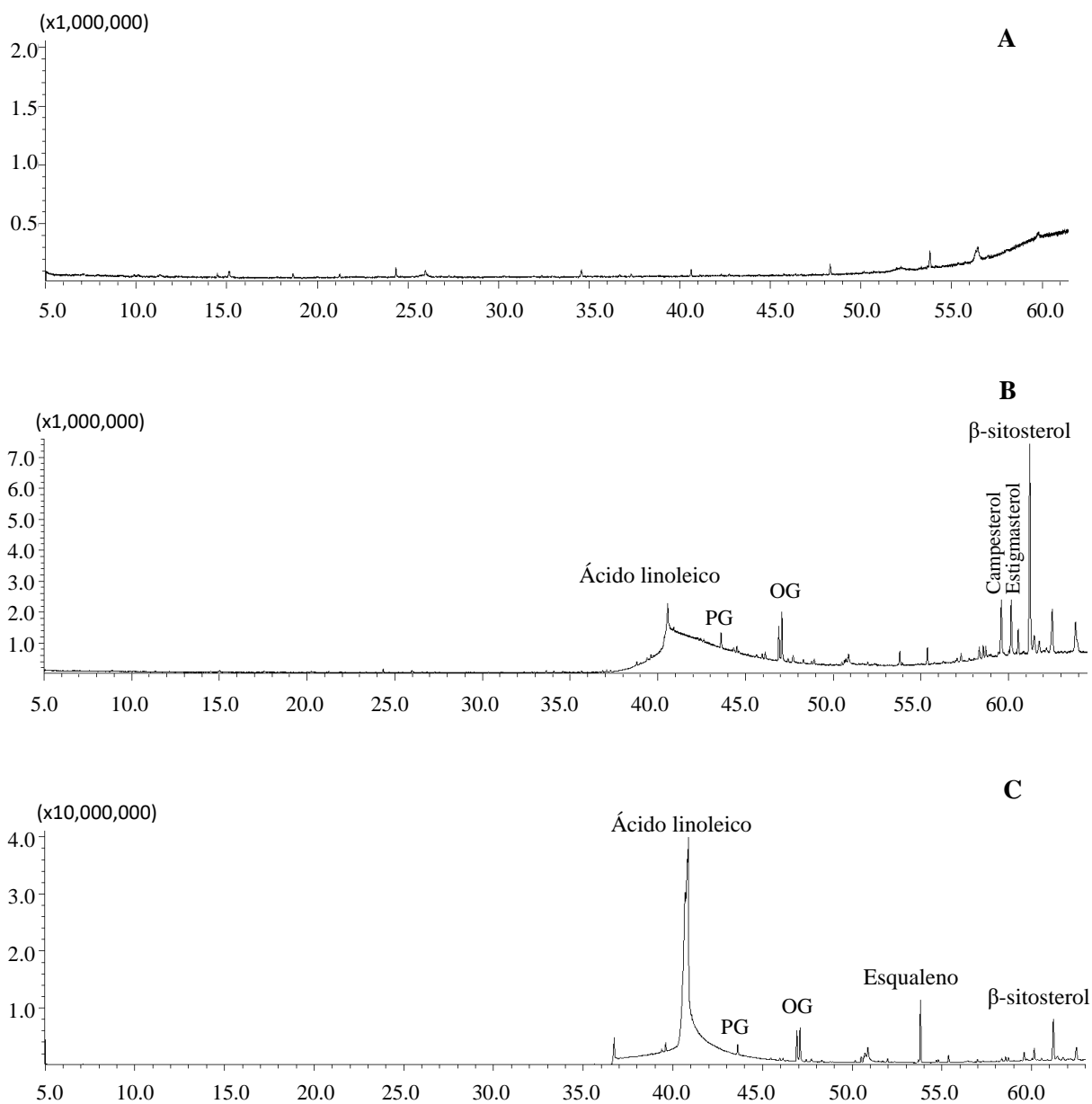


Figura A4 – Cromatogramas (*splitless*; varrimento) das amostras de açúcar (A), de arroz basmati (B) e de arroz agulha (C), nos quais se pode verificar que não foi detetado nenhum sinal de MOH nos extratos de hexano.

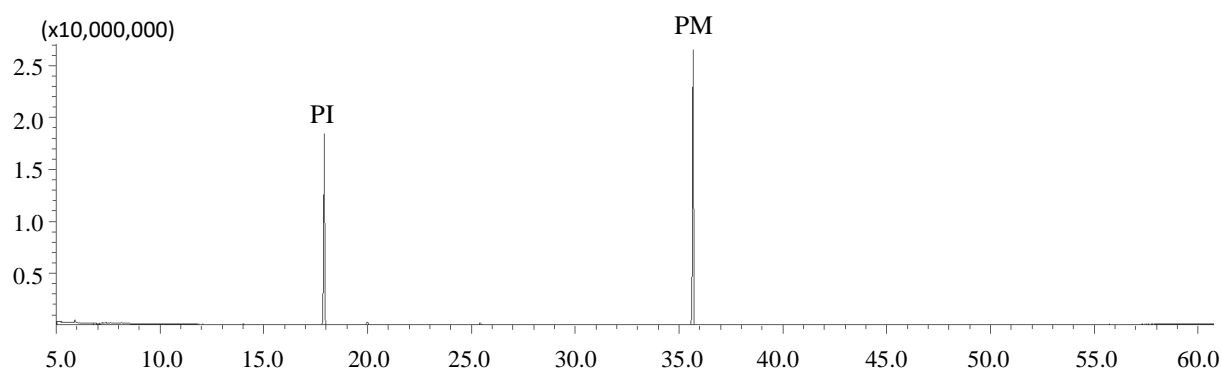


Figura A5 – Cromatograma (*splitless*; varrimento) do padrão PM 5, onde estão identificados os sinais do PI (0,0520 mg/ml) aos 17,9 min e do PM (0,0629 mg/ml) aos 35,6 min.

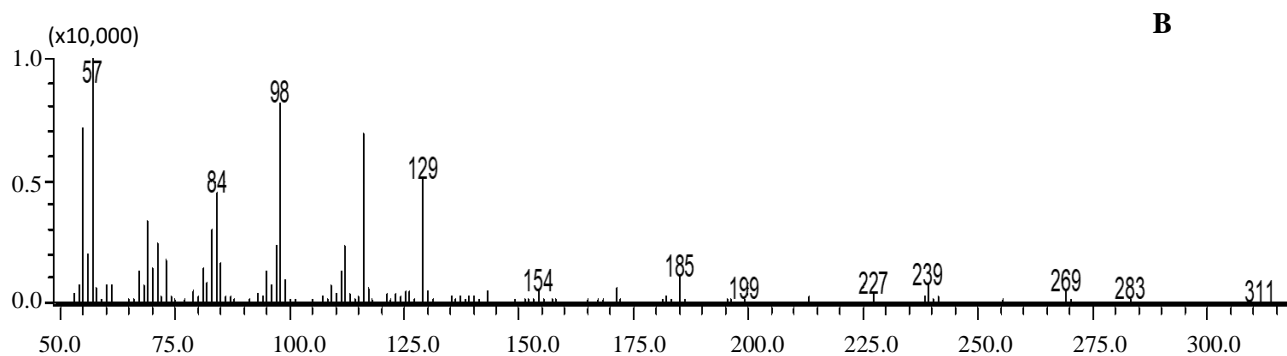
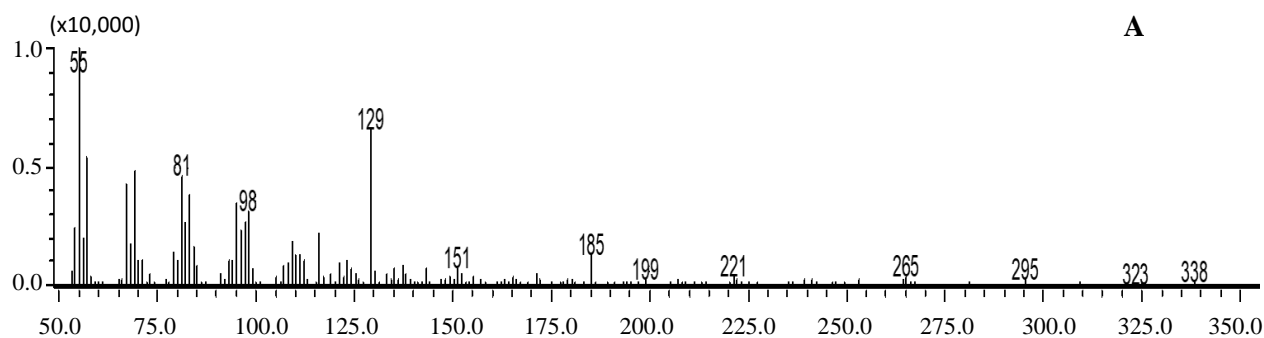


Figura A6 – Espectros de MS obtidos do TIC das amostras e que foram identificados pela livreria do equipamento como correspondendo o oleato de glicidilo (A) e ao palmitato de glicidilo (B).